



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

CRISTIAN STATKIEVICZ

**Estudo comparativo entre o Bonefill e o Bio-Oss na
enxertia óssea de seios maxilares com elevação da
membrana sinusal: análise histométrica e
imunoistoquímica**

Araçatuba - SP
2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

CRISTIAN STATKIEVICZ

**Estudo comparativo entre o Bonefill e o Bio-Oss na
enxertia óssea de seios maxilares com elevação da
membrana sinusal: análise histométrica e
imunoistoquímica**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia - Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Eduardo Hochuli Vieira.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo dos Santos Pereira.

Araçatuba - SP
2022

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S797e Statkiewicz, Cristian.
Estudo comparativo entre o Bonefill e o Bio-Oss na enxertia óssea de seios maxilares com elevação da membrana sinusal : análise histométrica e imunoistoquímica / Cristian Statkiewicz. - Araçatuba, 2022
73 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Eduardo Hochuli Vieira
Coorientador: Prof. Rodrigo dos Santos Pereira

1. Seio maxilar 2. Osso e ossos 3. Substitutos ósseos I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dedicatória

A Deus

Agradeço à Deus por ter me dado a oportunidade de seguir o meu sonho, por ter colocado ao meu lado pessoas que me conduziram, que me apoiaram e que agora compartilham desse alegre momento junto a mim.

Obrigado meu Senhor e meu Deus, eu sei que estava comigo durante os momentos de alegria e de angústia, durante os sorrisos e as lágrimas, entrego essa conquista em tuas mãos, pois tú me destes força e coragem para persistir.

Obrigado Nossa Senhora por ter iluminado meu caminho na direção do aprendizado e assim firmo meu compromisso de aplicar meus conhecimentos para o diagnóstico e tratamento de todo ser humano que assim necessitar.

*“Amai a Deus sobre todas as coisas”
(Mateus 22:37)*

À minha família

À minha esposa Nathalia Nihay Pimenta Fukushima Statkiewicz, minha companheira, quem eu escolhi para compartilhar minha vida, minhas conquistas, compartilhar nossos sonhos, que soube ter paciência e confiança nas minhas ausências durante os afazeres da pós-graduação. Meu grande amor que sempre me apoiou e me fez persistir, eu te amo e sempre terá minha admiração com esposa, mãe e mulher. Te amo. Meu imenso agradecimento ao nosso maior presente, nosso filho Novak Fukushima Statkiewicz, meu pequeno, meu japolaquinho, seu sorriso renova nossos corações. Toda a força e dedicação que eu e sua mãe temos, servirá como exemplo para sua formação e seu crescimento, PAPAI TE AMA MUITO MEU FILHO. Eu dedico toda a minha vida a vocês dois, minha família. Após escrita essas palavras, tivemos a maravilhosa notícia que de a mamãe está grávida novamente, e esperamos ansiosamente por esse menininho ou menininha que Deus nos abençoou. Amo muito vocês.

Aos meus pais, Gerônimo Statkiewicz e Cecília Koswoski Statkiewicz, obrigado por me ensinarem a ser uma pessoa de fé. Cresci vendo o amor e o compromisso de vocês pelo meu futuro e isso me fez se dedicar incansavelmente. Obrigado pelo apoio e pela confiança depositada em mim, jamais alcançaria o que alcancei sem vocês ao meu lado. Obrigado meu pai por dedicar sua vida de intenso trabalho na formação de seus filhos. Obrigado minha mãe por toda a preocupação, obrigado por todas as orações. Eu amo vocês.

À minha irmã Tatiane Statkiewicz de Farias e ao meu cunhado Eziquiel Thiago de Farias aos meus sobrinhos João Gabriel e Carolina. Agradeço por todo apoio que me deram para realização do meu sonho, pelas horas que passaram conversando comigo me orientando pelo melhor, por todas as orações destinadas ao meu sucesso. Eu amo vocês.

Ao meu sogro Nilton Fukushima e Luiza Dib Palma Pimenta Fukushima, aos cunhados e cunhadas, Nilton e Bruna, Arthur, Tania e a pequena Agatha. Muito obrigado pela inúmeras risada e almoços de Domingo, e por toda ajuda que sempre nos fez fortes.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Eduardo Hochuli Vieira, obrigado por confiar seu trabalho a mim, trabalho esse que conduzimos com muita dedicação, paciência e confiança. Levar seu nome no currículo com certeza é um sonho para todo cirurgião buco maxilo facial. Muito obrigado.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Rodrigo Pereira, obrigado por compartilhar de todo seu conhecimento e experiência nesse trabalho, obrigado por esclarecer minhas inúmeras dúvidas. Muito obrigado professor.

Ao Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior, Prof. Dr. Francisley Ávila Souza, Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dra Alessandra Aranega, Profa Dra. Daniela Ponzoni e a Profa. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi, ao Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, meus agradecimentos por terem contribuído para minha formação.

Ao Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani que me ajudou e me indicou os caminhos dentro da pós-graduação, você me estendeu a mão para que eu pudesse subir. Obrigado meu grande amigo, estou sempre torcendo pelo seu sucesso, e em breve os estudantes de odontologia do mundo estarão aprendendo através dos seus estudos.

Ao Prof. Dr. Edilson Ervolino e a Profa. Dra. Roberta Okamoto, meu orientador e coorientadora do mestrado que me direcionaram dentro da pós-graduação e me iniciaram na docência.

Ao Prof. Dr. Laerte Luiz Bremm, Profa. Dra. Cristina Sayuri Nishimura Miura, Profa Dra. Daniela Boleta e ao Prof. Dr. Wagner Basseggio, professores que me ensinaram e me incentivaram durante toda minha graduação a seguir na carreira da docência, muito obrigado.

Aos meus irmãos Anderson e Tiburtino que me acolheram e se tornaram parceiros irmão pra vida toda, ao grande Gestter que sempre me estendeu a mão quando precisei saiba que sempre estarei a disposição meu irmão. Bruno Mendes famoso Brunão obrigado por tudo que fez por mim e na ajuda do desenvolvimento desse trabalho. Ao meu grande amigo Valthierre Nunes pelas inúmeras conversas de incentivo. Agradecimento aos colegas da pós-graduação Thais, Luan, William, Leonardo, Gustavo Momesso.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara e ao vice-diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

Aos preceptores da residência em cirurgia e traumatologia buco maxilo facial da Universidade Estadual de Londrina, Dr. Glaykon Stabile, Dra Cecilia Stabile, Dra Ligia Pozzobon, Dr. Ricardo Mateus, Dr Heldelson Borges, participaram fortemente da minha formação cirúrgica.

Aos meus irmãos que a residência me deu Eduardo Dallazen meu querido Dala, Christopher Gibim meu irmão e meu parceiro pra todo momento, Vinicius meu querido Vinão mora no meu coração, Denise Furtado minha irmã pé frio de plantão, Renan Cardoso querido Renanzão e Bruna Barcelos.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, em especial aos dos departamentos de Cirurgia e Clínica Integrada e Ciências Básicas, muito obrigado pela colaboração na realização desse trabalho. Aos pacientes participantes da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)
- Código de Financiamento 001 - 88882.435600/2019-01, pela concessão da bolsa de doutorado.

Obrigado a Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial.

Muito obrigado!

Epígrafe

“Por mais que os homens e mulheres sejam vistos por seus feitos, eles ainda são reconhecidos por suas faces”

Charles G. Child III

Resumo

Statkievicz C. Estudo comparativo entre o Bonefill e o Bio-Oss na enxertia óssea de seios maxilares com elevação da membrana sinusal: análise histométrica e imunoistoquímica [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2022.

RESUMO

Objetivo: Comparar através de análise histométrica, imunoistoquímica o comportamento dos biomateriais Bonefill, Bio-Oss e do osso autógeno na enxertia de seios maxilares de humanos. **Metodologia:** 18 seios maxilares foram enxertados divididos em 3 grupos sendo o grupo autógeno controle; Grupo Bonefill; Grupo Bio-Oss. Após 6 meses as biópsias foram realizadas no sítio de instalação dos implantes. **Resultados:** A histometria apresentou maior formação óssea para o Bonefill ($p < 0,002$) em relação ao Bio-Oss, e maior presença de biomaterial remanescente para o Bio-Oss. A imunoistoquímica apresentou um padrão de maturação óssea maior para o Bonefill em relação ao Bio-Oss. **Conclusão:** Concluímos dentro dos limites desse estudo, o Bonefill apresentou maior quantidade osso neoformado e menor quantidade de tecido conjuntivo medular em relação ao Bio-Oss.

Palavras-chave: Seio Maxilar. Osso Autógeno. Substitutos Ósseos.

Abstract

Statkievicz C. Comparison between bone study and bone biograft of maxillary bones with sinus membrane extension: histometric and immunohistochemical analysis. [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2022.

ABSTRACT

Objective: To compare through histometric and immunohistochemical analysis of the behavior of Bonefill, Bio-Oss and autogenous bone biomaterials in human maxillary sinus grafting.

Methodology 18 selectors were grafted maxima divided into 3 groups being the autogenous control group; Bonefill Group; Bio-Oss Group. After 6 months, biopsies were performed at the implant placement site.

Results: Histometry showed greater bone formation for Bonefill ($p < 0,002$) in relation to Bio-Oss, and greater presence of remaining biomaterial for Bio-Oss. Immunohistochemistry showed a higher maturation pattern for Bonefill in relation to Bio-Oss.

Conclusion: We concluded, within the limits of this study, Bonefill presented a greater amount of neoformed bone and a smaller amount of medullary connective tissue in relation to Bio-Oss.

Keywords: Maxillary Sinus, Autogenous Bone, Bone Substitute.

Listas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografia do grupo Bonefill, aumento de 12,5x coloração Hematoxilina & Eosina.	50
Figura 2: Fotomicrografia do grupo Bio-Oss, aumento de 12,5x coloração Hematoxilina & Eosina.	51
Figura 3: Fotomicrografia do grupo autógeno, aumento de 12,5x coloração Hematoxilina & Eosina.	52
Figura 4: Padrão de imunomarcação para OC, (A) Bonefill, (B) Bio-Oss, (C) Autógeno.	53
Figura 5: Padrão de imunomarcação para RUNX2, (A) Bonefill, (B) Bio-Oss, (C) Autógeno.	54
Figura 6: Padrão de imunomarcação para VEGF, (A) Bonefill, (B) Bio-Oss, (C) Autógeno.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado da histometria para o Bonefill, Bio-Oss e autógeno.	47
Tabela 2: Resultado estatístico para tecido ósseo.	47
Tabela 3: Resultado estatístico para biomaterial remanescente.	47
Tabela 4: Resultado estatístico para tecido conjuntivo medular.	47
Tabela 5: Resultado para as imunomarcações de VEGF, RUNX2 e OCN.	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Taxa de formação óssea entre os grupos.	57
Gráfico 2: Taxa de biomaterial remanescente entre os grupos.	58
Gráfico 3: Taxa de tecido conjuntivo medular entre os grupos.	59

LISTA DE ABREVIATURAS

% porcentagem

°C graus Celsius

< menor

± mais ou menos

µg micrograma

µg/kg microgramas por quilograma

µl microlitro

µm micrômetro

ANOVA Análise de Variância

cm² centímetro quadrado

CONEP Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

DAB Diaminobenzidina

EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA Estados Unidos da América

FOA Faculdade de Odontologia de Araçatuba

g gramas

HE hematoxilina e eosina

mg miligrama

ml mililitros

mm² milímetros quadrados

OCN osteocalcina

pH Potencial hidrogeniônico

RUNX-2 fator de transcrição relacionado a Runt 2

s segundos

VEGF fator de crescimento do endotélio vascular

HIF-a – fator induzido por hipóxia

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: Comitê de ética	61
ANEXO B: Normas para publicação segundo o periódico <i>International Journal Oral and Maxillofacial Surgery</i>	64

Sumário

SUMÁRIO

1 MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO - ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O BONEFILL E O BIO-OSS NA ENXERTIA ÓSSEA DE SEIOS MAXILARES COM ELEVÇÃO DA MEMBRANA SINUSAL: ANÁLISE HISTOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA	23
1.1 Página Título.....	23
1.2 Resumo	24
1.3 Abstract.....	25
1.4 Introdução.....	26
1.5 Materiais e métodos.....	29
1.6 Resultados.....	34
1.7 Discussão	36
1.8 Conclusão	40
1.9 Referências	41
TABELAS	46
FIGURAS	49
ANEXOS	60

*Manuscrito para
publicação*

1 MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO - ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O BONEFILL E O BIO-OSS NA ENXERTIA ÓSSEA DE SEIOS MAXILARES COM ELEVAÇÃO DA MEMBRANA SINUSAL: ANÁLISE HISTOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA¹

Autores:

Cristian Statkievicz ¹

Rodrigo dos Santos Pereira ²

Bruno Coelho Mendes ¹

Anderson de Souza Santos ¹

Roberta Okamoto ²

Eduardo Hochuli Vieira ²

1 - CD, Aluno de Doutorado em Odontologia (Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial), Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Brasil.

2 - CD, ME, DR, Prof Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Brasil.

Autor correspondente:

Endereço: Rua José Bonifácio, 1193 - Araçatuba/SP - CEP 16015-050 Fax: (+55) - (18)3636-3200

E-mail: c.statkievicz@gmail.com

¹ Normatização segundo a revista *International Journal Oral and Maxillofacial Surgery*

1.1 Resumo

Objetivo: Comparar através de análise histométrica, imunoistoquímica o comportamento dos biomateriais Bonefill, Bio-Oss e do osso autógeno na enxertia de seios maxilares de humanos.

Metodologia: 18 seios maxilares foram enxertados divididos em 3 grupos sendo o grupo autógeno controle; Grupo Bonefill; Grupo Bio-Oss. Após 6 meses as biópsias foram realizadas no sítio de instalação dos implantes. **Resultados:** A histometria apresentou maior formação óssea para o Bonefill ($p < 0,002$) em relação ao Bio-Oss, e maior presença de biomaterial remanescente para o Bio-Oss. A imunoistoquímica apresentou um padrão de maturação óssea maior para o Bonefill em relação ao Bio-Oss. **Conclusão:** Concluímos dentro dos limites desse estudo, o Bonefill apresentou maior quantidade osso neoformado e menor quantidade de tecido conjuntivo medular em relação ao Bio-Oss.

Palavras-chave: Seio Maxilar. Osso Autógeno. Substitutos Ósseos.

1.2 Abstract

Objective: To compare through histometric and immunohistochemical analysis of the behavior of Bonefill, Bio-Oss and autogenous bone biomaterials in human maxillary sinus grafting.

Methodology 18 selectors were grafted maxima divided into 3 groups being the autogenous control group; Bonefill Group; Bio-Oss Group. After 6 months, biopsies were performed at the implant placement site.

Results: Histometry showed greater bone formation for Bonefill ($p < 0,002$) in relation to Bio-Oss, and greater presence of remaining biomaterial for Bio-Oss. Immunohistochemistry showed a higher maturation pattern for Bonefill in relation to Bio-Oss.

Conclusion: We concluded, within the limits of this study, Bonefill presented a greater amount of neoformed bone and a smaller amount of medullary connective tissue in relation to Bio-Oss.

Keywords: Maxillary Sinus, Autogenous Bone, Bone Substitute.

1.3 Introdução

A perda dos dentes cria um impacto negativo na qualidade de vida¹ e está classificada na 36^o posição das 100 doenças crônicas que interferem diretamente na saúde sistêmica. A dificuldade de mastigação, deglutição, fonação e estética são modificadas negativamente na ausência dos dentes.^{2,3} Essa condição se intensifica na população idosa e não depende do sexo.² A perda precoce dos dentes na região posterior da maxila provoca um grau severo de reabsorção óssea, com um fino osso basal que impossibilita a instalação de implantes sem a enxertia prévia.^{4,5}

Boyne & James,⁶ publicaram a técnica para acesso lateral ao seio maxilar pela elevação de membrana sinusal permitindo a enxertia. O osso autógeno apresenta-se como uma opção viável de enxerto, com propriedades de osteoindução, osteocondução e osteogênese. No entanto a necessidade de uma área doadora e a grande diminuição do volume do enxerto a longo prazo, abriu espaço para o desenvolvimento e aplicação de biomateriais.⁷⁻¹¹ O biomaterial ideal deve apresentar características biológicas como: ser biocompatível, promover atração de células osteogênicas, aderir ao osso do hospedeiro, apresentar porosidade com interconectividade permitindo a migração celular, não ser antigênico e compartilhar carga mecânica com o osso do hospedeiro durante o processo de reparo e remodelação óssea.¹²⁻¹⁵

A hidroxiapatita derivada de cortical óssea bovina Bio-Oss®, (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça), é intensamente utilizado como substituto ósseo apresentando morfologia ideal, com características que se assemelham a estrutura óssea humana. Possui elevadas taxas de sucesso na sustentação de implantes variando de 98.2% a 100%, sendo um padrão comparativo para o estudo de outros biomateriais.^{11,16-20}

O Bonefill® (Bionnovation – São Paulo – Brasil) é uma proposta para enxerto ósseo que possui uma matriz óssea inorgânica mineralizada bovina, totalmente desnaturada, com propriedades previstas de osteocondução, formação matriz mineral pelos poros adequados para a proliferação endotelial, promovendo neoformação óssea satisfatória. Bonefill é parcialmente remodelado por ação de osteoclastos e osteoblastos, sendo uma alternativa viável ao osso autólogo em defeitos adequados para o seu uso e indicação, no entanto estudos comparativos sobre seu comportamento e eficácia na enxertia em seio maxilar em humanos são escassos.²¹⁻²⁶

1.4 Objetivo

O objetivo do presente estudo é avaliar o padrão de formação óssea do Bonefill comparando com o Bio-Oss e osso autógeno por meio de análise histométrica e imunohistoquímica. A hipótese nula é que não haverá diferença na porcentagem de osso formado entre o Bio-Oss e o Bonefill.

1.5 Material e Método

Esse estudo clínico randomizado foi realizado na Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” e foi cadastrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) por meio da Plataforma Brasil e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - FOA/UNESP, sob parecer 17281119.4.0000.5420 e seguiu a declaração de Helsinki. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Os critérios de inclusão foram, pacientes com atrofia do rebordo alveolar da região posterior da maxila, sendo altura óssea de 5mm ou inferior que queriam ser reabilitados com implantes dentais. Os pacientes que apresentaram comprometimentos sistêmicos não controlados, problemas periodontais não tratados, patologias sinusais, tabagistas, irradiados na região da cabeça ou pescoço, com a presença de raízes residuais no seio maxilar foram excluídos do estudo.

Para a execução do estudo o cálculo amostral foi determinado pelo resultado do power test estatístico através do programa estatístico Sigma Plot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, CA, EUA) com base nos resultados de estudo prévio.²⁷ Os dados de área de osso neoformado foram acessados, encontrando diferença entre média de 15.1, com desvio padrão de 9.9, nível de significância de 5% e poder do teste atribuído à 80%.

Um total de 18 seios maxilares enxertados foram divididos por sorteio em 3 grupos. Grupo autógeno: 6 seios maxilares enxertados com osso autógeno do ramo mandibular ou da sínfise. Grupo Bonefill: 6 seios maxilares enxertados com osso xenógeno Bonefill® (Porous) (Bionnovation Biomedical - São Paulo/Brasil). Grupo Bio-Oss: 6 seios maxilares enxertados com osso xenógeno Bio-Oss® (Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça).

Para todos os pacientes, foram realizadas tomografias computadorizadas cone beam pré-operatória, para avaliar o seio maxilar, região retromandibular e a sínfise mandibular, determinando a altura óssea na região posterior de maxila e o volume ósseo dos sítios doadores do enxerto ósseo autógeno.

Procedimento cirúrgico

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia local com lidocaína com adrenalina 1:1000.000 (DFL – Jacarepaguá/RJ) ou mepivacaína associado à adrenalina 1:100.000 (DFL – Jacarepaguá/RJ). Durante a primeira semana os pacientes foram medicados com 500 mg de dipirona sódica (EMS; São Paulo, SP, Brasil) 4 vezes ao dia para analgesia, se necessário e, 500 mg de amoxicilina (EMS; São Paulo-SP/Brasil) 3 vezes ao dia para reduzir as chances de infecção. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um cirurgião calibrado, na clínica de cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba e por meio de um rigoroso protocolo asséptico.

Coleta do enxerto ósseo autógeno

O osso da região sinfisária foi acessado através de uma incisão na mucosa labial com extensão de canino a canino até o músculo mental. Em seguida, a lâmina foi direcionada para o osso incisando músculo e periósteo. O retalho foi descolado com um descolador de Molt N°. 9 (Golgran; São Caetano do Sul, SP, Brazil) expondo a região, Os limites do bloco foram delimitados da seguinte forma: 5 mm abaixo das raízes dentárias superiormente, acima da protuberância mentoniana inferiormente e nas raízes dos caninos lateralmente como preconizado por Misch.⁹ A osteotomia foi realizada com uma broca 701 (KG Sorensen; Cotia, SP, Brazil) sob constante irrigação com solução salina a 0.9% (Darrow; Rio de Janeiro, RJ, Brazil). A região retromolar foi acessada através

de um acesso intra-oral similar ao da osteotomia sagital, osteotomizado com uma broca 701 e removido com um cinzel Capelli.²⁸ Os blocos ósseos foram triturados por um particulador ósseo (Neodent; Curitiba-PR, Brasil).

Procedimento de elevação da membrana sinusal

O acesso ao seio maxilar foi realizado também por anestesia local com os mesmos anestésicos propostos e de acordo com a técnica preconizada por Boyne & James⁶ sob anestesia previamente descrita. Com uma lâmina n° 15 (Solidor® - Barueri/SP) acoplada a um cabo de bisturi, uma incisão crestal foi realizada no osso maxilar para exposição da parede óssea lateral. Com uma broca diamantada esférica n° 6 (KG Sorensen – Cotia/SP) e sob irrigação copiosa com soro fisiológico 0.9% (ADV – Nova Odessa/SP), uma fenestração foi feita para acesso à membrana do seio maxilar. Elevadores de membrana sinusal (Neodent – Curitiba/Brasil) foram utilizados para o cuidadoso processo de elevação da mesma e os enxertos foram colocados. As feridas foram suturadas com fio absorvível de poligalactina 4.0 Ethicon (Johnson & Johnson – São Paulo/Brasil).

Coleta das amostras

As amostras dos enxertos sinusais foram coletadas aos 6 meses pós-operatório por meio de trefina de 3mm de diâmetro externo (MK Life – Porto Alegre,RS, Brasil) nos locais de instalação dos implantes. A seguir, foram acondicionadas em solução de formalina tamponada 10%, PH = 7, por 48 horas mantendo a orientação apico-coronal.

Processamento para análise histológica e histométrica

Após o período de 48 horas de acondicionamento em formaldeído 10%, em prosseguimento as amostras foram submetidas à lavagem em água corrente por 24 horas, e imersas em solução desmineralizadora (constituída de PBS acrescida de 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA, durante 4 semanas). Após a desmineralização, as peças foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas, impregnadas em parafina, e seccionadas em micrótomo com 5 µm de espessura. Foram obtidos 4 cortes de cada amostra, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina para a análise morfológica da neoformação do tecido ósseo, dos remanescentes dos biomateriais e do tecido mole (tecido conjuntivo). As lâminas foram codificadas em 3 áreas da amostra: leito (2mm acima do leito ósseo do seio maxilar), intermediária e apical (2 mm abaixo da membrana do seio maxilar), as imagens foram obtidas com uma câmera digital (JVC TK1270 Color Video Câmera) acoplada ao microscópio, em objetiva de 12,5x e analisadas por meio da grade de Merz por um único avaliador de acordo com Pereira et al.²⁹ e Merz.³⁰ As imagens, com a grade anexada, foram montadas no programa PowerPoint for Mac (Microsoft®, Redmond-WA, EUA) onde foram contados os pontos referentes a serem analisados para, enfim, obter o percentual de osso neoformado, de tecido conjuntivo e biomaterial remanescente da amostra.

Processamento para análise imunoistoquímica

As reações imunoistoquímicas foram realizadas pela técnica da imunoperoxidase endógena. Anticorpos primários policlonais produzidos em cabras para Runx2 (Goat anti- Runx2 – Santa Cruz Biotechnology, SC8566), VEGF (Goat anti-VEGF - Santa Cruz Biotechnology, SC1881) e Osteocalcina (Goat anti-Osteocalcina – Santa Cruz Biotechnology, SC18319) foram utilizados para investigar o comportamento dos biomateriais em relação as

reações reparacionais do tecido ósseo: atividade osteoblástica (Runx2), angiogênica (VEGF) e mineralização/maturação do tecido ósseo (osteocalcina).

Como anticorpos secundários, foram utilizados os anticorpos contra IgG de cabra biotilado (anti-Goat IgG-HRP, PIERCE). O método de detecção foi efetuado por imunoperoxidase e a 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) utilizada como cromógeno seguido pela contra-coloração nuclear com Hematoxilina de Harri's. Os procedimentos de controle foram feitos pela omissão dos anticorpos primários (controle negativo).

Secções longitudinais de 5µm das peças anatômicas foram colocadas em lâminas histológicas e desparafinizadas de acordo com protocolo padrão. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada 3% (Perhidrol 30% H₂O₂ - MERCK) por 45 minutos. As secções sofreram recuperação antigênica por tampão citrato (pH 6,0 – 55°C) e posteriormente foram incubadas por 18h a 4°C com anticorpos primários específicos para as proteínas a serem analisadas e em concentrações previamente testadas e padronizadas. Após 18h as lâminas foram lavadas com PBS (3 banhos) e incubados com um segundo anticorpo biotilado, por mais 1h à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em PBS e re-incubadas com o complexo Avidina-biotina (Strept ABCComplex/HRP-Vector) por 45 min. As áreas avaliadas das amostras seguiram o mesmo padrão da análise histométrica: leito receptor, intermediário e apical. O padrão de distribuição da imunocoloração foi analisado qualitativamente como relatado por Manrique et al.³¹ atribuindo-se os scores 0 (sem marcação), 1 (fraca/difusa), 2 (moderada) e 3 (intensa), a fim de avaliar a expressão das proteínas. A análise foi realizada em microscópio óptico convencional e os scores foram atribuídos por um único observador, previamente calibrado.

1.6 Resultados

Análise histomorfométrica

Os resultados histométricos da área de osso formado, biomaterial e tecido conjuntivo medular podem ser encontrados na Tabela 1. O teste ANOVA 1 fator seguido pelo pós-teste de Tukey indicou diferença estatisticamente significativa na formação do tecido ósseo entre os grupos Bonefill e Bio-Oss ($p < 0,002$), e o Bio-Oss para o autógeno ($p < 0,022$) (Gráfico 1). Para o tecido conjuntivo medular houve diferença entre o Bonefill e o Bio-Oss ($p < 0,032$) onde o Bio-Oss apresentou maior quantidade (Gráfico 3). Para os remanescentes de biomaterial foi realizado o teste de Manm-Whitney e o Bio-Oss apresentou maior quantidade, com diferença estatística ($p < 0,017$) em relação ao Bonefill (Gráfico 2), as demais comparações estatísticas estão expressas nas tabelas 2,3 e 4.

Para o grupo Bonefill um padrão de tecido ósseo com pouco tecido conjuntivo intertrabecular foi bem característico em todos os espécimes avaliados, com pouco biomaterial remanescente em toda a área de interesse, com grande incorporação de tecido ósseo maduro pela presença de lacunas preenchidas por osteócitos. (Figura 1).

Para o grupo Bio-Oss foi notada a permanência de grande quantidade de partículas de biomaterial envolta por tecido ósseo neoformado e entremeado por tecido conjuntivo em desenvolvimento com infiltrado inflamatório, e um padrão de tecido ósseo envolto por uma matriz conjuntiva não mineralizada predominou em todos os espécimes avaliados. (Figura 2)

Analisando a histologia das imagens nota-se que o grupo autógeno apresentou formação de tecido ósseo maduro com a presença de tecido conjuntivo medular organizado, vascularizado e apresentou grande quantidade de lacunas preenchidas por osteócitos. (Figura 3)

Análise imunoistoquímica

Os anticorpos primários utilizados foram selecionados para avaliar o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), caracterizando a atividade osteocondutora; o RUNX-2, um fator de transcrição que mostra a atividade pré-osteoblástica assim como a Osteocalcina, um marcador da mineralização óssea. A região de interesse avaliada foi o centro da amostra coletada através da trefina de 3 mm de diâmetro.

A osteocalcina, (Fig 4.) um marcador de mineralização e a proteína não colágena predominante no tecido ósseo, foi observada de forma moderada no grupo Bonefill, onde foi possível observar a precipitação deste marcador nas áreas de tecido mineralizado. No grupo Bio-Oss, observou-se a presença da osteocalcina nas áreas de tecido mineralizado assim como no tecido conjuntivo não mineralizado presente próximo às áreas de tecido ósseo. A osteocalcina mostrou-se marcada de forma intensa nos espécimes do grupo Bio-Oss e autógeno. (Tabela 5)

A presença do fator de transcrição RUNX2 (Fig 5.) foi observado de maneira discreta no grupo autógeno e no grupo Bonefill onde poucas células fora do tecido ósseo foram observadas na região de interesse. No grupo Bio-Oss, mais uma vez, pela grande presença de tecido conjuntivo não mineralizado, observou-se uma marcação intensa de RUNX2 nas células presentes nesta matriz e próximas às áreas de tecido mineralizado. (Tabela 5)

Foi observada uma marcação discreta para o VEGF (Fig 6.) no grupo Bonefill, presente pontualmente nas regiões onde foi observada a presença de um tecido conjuntivo medular não mineralizado junto ao trabeculado ósseo predominante na região de interesse. No grupo Bio-Oss observou-se uma marcação intensa, com a presença de vasos e uma matriz extracelular não

mineralizada bastante marcada em toda a região de interesse, o grupo autógeno obteve marcação moderada. (Tabela 5)

1.7 Discussão

A utilização de biomateriais na enxertia de seios maxilares para o aumento do volume ósseo, que possibilite a instalação de implantes, ampliou a procura por um biomaterial ideal. O Bonefill apresenta uma matriz óssea inorgânica mineralizada bovina, com propriedades semelhantes ao Bio-Oss considerado um padrão comparativo entre outros biomateriais, porém os estudos em humanos com Bonefill são escassos.²³

Neste trabalho a hipótese nula nula foi rejeitada. A análise histométrica, apresentou uma maior porcentagem estatisticamente significativa de osso neoformado para o Bonefill em 61,9% em comparação com o Bio-Oss 34,08%, Bonardi et al.¹⁹ compararam o Bio-Oss, b-TCP, autógeno e esses mesmos biomateriais associados, e encontraram uma área de osso neoformado superior para o osso autógeno e b-TCP, nesse estudo os grupos autógeno e Bonefill apresentaram maiores taxas de formação óssea sem diferença estatística entre eles.

Pereira et al ³², avaliaram em um estudo em humanos a taxa de formação óssea do Biogran, associado ou não ao osso autógeno em seio maxilar, os autores apresentaram uma formação óssea média de 42,7% nas para o Biogran puro, 38,5% associado ao autógeno e 37,5% do autógeno puro, esses resultados se assemelham ao encontrado em nosso estudo.

Embora ambos os biomateriais testados são de origem bovina os diferentes processo de manufatura interferem diretamente nas propriedade físico-química do osso induzindo respostas biológicas diferentes,²⁴ isso pode estar relacionado a grande diferença entre a quantidade de biomaterial remanescente entre os grupos, observamos uma baixa quantidade de partículas remanescentes no grupo Bonefill 2,17% onde na maior parte das espécimes avaliadas não foi possível distinguir regiões de partículas remanescentes do osso neoformado, no grupo Bio-Oss a

presença de partículas foi facilmente identificada. Shirmohammadi et al.³³ compararam o Bio-Oss ao hidroxiapatita nanocristalina, onde a formação óssea do Bio-Oss foi menor que quantidade partículas residual que correspondeu a 33% da amostra. Embora a quantidade de partículas encontradas foi considerável, essas apresentavam íntimo contato com o osso com poucas células inflamatórias estando de acordo com outros estudos.^{19,33}

Acreditamos ser esse estudo o primeiro a avaliar o comportamento histológico e a expressão de proteínas relacionadas a formação óssea utilizando o Bonefill em humanos. Manfro et al.²³ investigou o comportamento do Bonefill, Bio-Oss e o GenOx enxertados em crânios de coelhos através do auxílio de cilindros de titânio. Os resultados mostraram um osso mais denso e organizado com poucas fibras colágenas e pouco remanescente de biomaterial no grupo Bonefill e Bio-Oss, com um osso melhor estruturado no Bonefill. Os autores ressaltam a presença de porosidade nesses biomateriais pela reabsorção da partícula, essa porosidade foi apontada como um dos principais fatores para a propriedade de osteocondução dos biomateriais.^{18,34,35}

Grossi-Oliveira et al.²⁵ compararam diferentes biomateriais em defeitos críticos de calcárias de coelhos, onde o Bonefill apresentou uma baixa osteocondução e formação óssea em relação ao Bio-Oss, Lumina Bone e Clonos Dental.²⁵ No entanto esses estudos com Bonefill foram realizados em animais, e em regiões com características muito distintas das apresentadas pelo seio maxilar de humanos, dificultando os padrões comparativos. Dos poucos estudos que utilizaram o Bonefill, Alves³⁶ comparou sua enxertia associado ao osso autógeno em seio maxilar de humano, comparando com uma área não enxertada, os resultados obtidos através da histometria foram semelhantes.

A formação óssea observada na análise histológica do Bonefill, mostrou pouco tecido conjuntivo intertrabecular, com um aspecto de osso maduro, isso se confirma quando comparamos com os dados da análise imunoistoquímica. O fator de crescimento do endotélio vascular VEGF tem a função de induzir a formação de novos vasos no interior do osso e estimular celular como osteoblastos, osteoclastos e células progenitoras.³⁷ O VEGF é estimulado entre a regulação de Runx2 e HIF-a que induz o recrutamento de osteoclastos e a reabsorção óssea.^{38,39}

O Bonefill apresentou uma marcação fraca para VEGF e RUNX2, isso identifica que o processo de inicial de formação de vasos sanguíneos e diferenciação de osteoblastos está em menor atividade, e o osso já está em fase de mineralização, expresso pela marcação moderada de osteocalcina. Tal padrão representa um osso maduro. Os dados apresentados para o Bio-Oss, mostraram-se bem distintos, com uma marcação intensa para as 3 proteínas, característico de uma formação óssea mais lenta, muito provavelmente pela permanência das partículas de biomaterial por um longo período, ainda com a formação de vasos sanguíneos e diferenciação de osteoblastos de uma maneira mais intensa aos 6 meses.

Pereira et al.³² encontraram marcação baixa para RUNX2 aos 6 meses para o enxerto com Biogran, indicando que após esse período o material não induz mais a diferenciação osteoblástica, assim como os achados de Pereira et al.²⁹ com o beta-tricalcio fosfato. Caubet et al.⁴⁰ concluíram que o Bio-Oss apresenta a propriedade de osteoindução somente em períodos iniciais, o que difere dos nossos resultados por encontrarmos uma forte marcação de RUNX2 aos 6 meses. Ainda nesse estudo de Pereira et al.³² eles encontraram uma marcação moderada de VEGF para todos os grupos.

Zang et al.⁴¹ relataram que a anatomia do seio maxilar pode interferir na formação óssea com diferentes respostas além das propriedades dos biomateriais, pois um seio mais largo com ângulo medial lateral maior a membrana exerce uma

pressão maior sobre o biomaterial, assim como um seio maxilar mais estreito, associado ou não a múltiplas perdas dentárias podem influenciar.⁴¹

Bonefill e Bio-Oss mostraram que mesmo com diferenças entre os padrões histológicos e imunoistoquímicos, esses biomateriais proporcionaram uma formação óssea adequada para a instalação dos implantes após 6 meses da enxertia. No entanto as limitações desse estudo se baseiam na impossibilidade de avaliar o período inicial da formação óssea por se tratar de um estudo em humanos.

1.8 Conclusão

Concluimos dentro dos limites desse estudo, o Bonefill apresentou maior quantidade osso neoformado e menor quantidade de tecido conjuntivo medular em relação ao Bio-Oss.

1.9 Referências

1. Gerritsen AE, Allen PF, Witter DJ, Bronkhorst EM, Creugers NH. Tooth loss and oral health-related quality of life: a systematic review and meta-analysis. *Health Qual Life Outcomes* 2010; 8: 126. doi: 10.1186/1477-7525-8-126
2. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, Murray CJ. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res* 2013; 92: 592-597. doi: 10.1177/0022034513490168
3. Musacchio E, Perissinotto E, Binotto P, Sartori L, Silva-Netto F, Zambon S, Manzato E, Corti MC, Baggio G, Crepaldi G. Tooth loss in the elderly and its association with nutritional status, socio-economic and lifestyle factors. *Acta Odontol Scand* 2007; 65: 78-86. doi: 10.1080/00016350601058069
4. Wagner F, Dvorak G, Nemeč S, Pietschmann P, Figl M, Seemann R. A principal components analysis: how pneumatization and edentulism contribute to maxillary atrophy. *Oral Dis* 2017; 23: 55-61. doi: 10.1111/odi.12571
5. Cruz RS, Lemos CAA, Batista VES, Oliveira HFFE, Gomes JML, Pellizzer EP, Verri FR. Short implants versus longer implants with maxillary sinus lift. A systematic review and meta-analysis. *Braz Oral Res* 2018; 32: e86. doi: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0086
6. Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg* 1980; 38: 613-616.
7. Wood RM, Moore DL. Grafting of the maxillary sinus with intraorally harvested autogenous bone prior to implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988; 3: 209-214.
8. Zijdeveld SA, Zerbo IR, van den Bergh JP, Schulten EA, ten Bruggenkate CM. Maxillary sinus floor augmentation using a beta-tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20: 432-440.
9. Misch CE. Maxillary sinus augmentation for endosteal implants: organized alternative treatment plans. *Int J Oral Implantol* 1987; 4: 49-58.
10. Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials* 1998; 19: 1419-1423. doi: 10.1016/S0142-9612(98)00133-1
11. Traini T, Degidi M, Sammons R, Stanley P, Piattelli A. Histologic and elemental microanalytical study of anorganic bovine bone substitution following sinus floor augmentation in humans. *J Periodontol* 2008; 79: 1232-1240. doi: 10.1902/jop.2008.070504
12. Wheeler SL. Sinus augmentation for dental implants: the use of alloplastic materials. *J Oral Maxil Surg* 1997; 55: 1287-1293. doi: 10.1016/s0278-2391(97)90186-5
13. Jones JR. Review of bioactive glass: from hench to hybrids. *Acta Biomater* 2013; 9: 4457-4486. doi: 10.1016/j.actbio.2012.08.023
14. Kirker-Head CA, Nevins M, Palmer R, Nevins ML, Schelling SH. A new animal model for maxillary sinus floor augmentation: evaluation parameters. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997; 12: 403-411.
15. Neamat A, Gawish A, Gamal-Eldeen AM. beta-Tricalcium phosphate promotes cell proliferation, osteogenesis and bone regeneration in intrabony defects in dogs. *Arch Oral Biol* 2009; 54: 1083-1090. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.09.003
16. Galindo-Moreno P, Padial-Molina M, Fernández-Barbero JE, Mesa F, Rodríguez-Martínez D, O'Valle F. Optimal microvessel density from composite graft of autogenous maxillary

- cortical bone and anorganic bovine bone in sinus augmentation: influence of clinical variables. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21: 221-227. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01827.x
17. Dinato TR, Grossi ML, Teixeira ER, Dinato JC, Sczepanik FS, Gehrke SA. Marginal bone loss in implants placed in the maxillary sinus grafted with anorganic bovine bone: a prospective clinical and radiographic study. *J Periodontol* 2016; 87: 880-887. doi: 10.1902/jop.2016.150514
 18. Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2012; 23: 263-273. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02168.x
 19. Bonardi JP, Pereira RDS, Boos Lima F, Faverani LP, Griza GL, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Prospective and randomized evaluation of ChronOS and Bio-Oss in human maxillary sinuses: histomorphometric and immunohistochemical assignment for Runx 2, vascular endothelial growth factor, and osteocalcin. *J Oral Maxillofac Surg* 2018; 76: 325-335. doi: 10.1016/j.joms.2017.09.020
 20. de Molon RS, Magalhaes-Tunes FS, Smedo CV, Furlan RG, de Souza LGL, de Souza Faloni AP, Marcantonio E Jr, Faeda RS. A randomized clinical trial evaluating maxillary sinus augmentation with different particle sizes of demineralized bovine bone mineral: histological and immunohistochemical analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2019; 48: 810-823. doi: 10.1016/j.ijom.2018.09.003
 21. Araujo DB, de Jesus Campos E, Oliveira MAM, Lima MJP, Martins GB, Araujo RPC. Surgical elevation of bilateral maxillary sinus floor with a combination of autogenous bone and lyophilized bovine bone. *J Contemp Dent Pract* 2013; 14: 445-450. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1342
 22. Carbonari M, Ludtke J, Santos PCV, Carvalho NTA, Gehrke SA. Characterization physical-chemical and biological the bovine bone graft, Bonefill in biological assays – Part 1. *ImplantNews* 2009; 6: 679-683.
 23. Manfro R, Fonseca FS, Bortoluzzi MC, Sendyk WR. Comparative, histological and histomorphometric analysis of three anorganic bovine xenogenous bone substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic. *J Maxillofac Oral Surg* 2014; 13: 464-470. doi: 10.1007/s12663-013-0554-z
 24. Desterro FP, Sader MS, Soares GD, Vidigal GM Jr. Can inorganic bovine bone grafts present distinct properties? *Braz Dent J* 2014; 25: 282-288. doi: 10.1590/0103-6440201300067
 25. Grossi-Oliveira G, Faverani LP, Mendes BC, Braga Polo TO, Batista Mendes GC, de Lima VN, Ribeiro Júnior PD, Okamoto R, Magro-Filho O. Comparative evaluation of bone repair with four different bone substitutes in critical size defects. *Int J Biomater* 2020; 2020: 5182845. doi: 10.1155/2020/5182845
 26. Azambuja Carvalho PH, Al-Maawi S, Dohle E, Sader RA, Pereira-Filho VA, Ghanaati S. Cellular response of human osteoblasts to different presentations of deproteinized bovine bone. *Materials* 2022; 15: 999. doi: 10.3390/ma15030999
 27. Pereira RS, Gorla LF, Boos F, Okamoto R, Garcia Junior IR, Hochuli-Vieira E. Use of autogenous bone and beta-tricalcium phosphate in maxillary sinus lifting: histomorphometric study and immunohistochemical assessment of RUNX2 and VEGF. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2017; 46: 503-510. doi: 10.1016/j.ijom.2017.01.002
 28. Capelli M. Autogenous bone graft from the mandibular ramus: a technique for bone augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003; 23: 277-285.

29. Pereira RS, Gorla LF, Boos F, Okamoto R, Garcia Junior IR, Hochuli-Vieira E. Use of autogenous bone and beta-tricalcium phosphate in maxillary sinus lifting: histomorphometric study and immunohistochemical assessment of RUNX2 and VEGF. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2017; 46: 503-510. doi: 10.1016/j.ijom.2017.01.002
30. Merz WA. Die Streckenmessung an gerichteten Strukturen im Mikroskop und ihre Anwendung zur Bestimmung von Oberflächen-Volumen-Relationen im Knochengewebe. *Mikroskopie* 1967; 22: 132-142.
31. Manrique N, Pereira CC, Luvizuto ER, Sánchez MP, Okamoto T, Okamoto R, Sumida DH, Antoniali C. Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Investig* 2015; 19: 1319-1327. doi: 10.1007/s00784-014-1369-0
32. Pereira, R. dos S., Menezes, J. D., Bonardi, J. P., Griza, G. L., Okamoto, R., & Hochuli-Vieira, E. (2017). Histomorphometric and immunohistochemical assessment of RUNX2 and VEGF of Biogran™ and autogenous bone graft in human maxillary sinus bone augmentation: A prospective and randomized study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 19(5), 867–875. doi:10.1111/cid.12507
33. Shirmohammadi A, Roshangar L, Chitsazi MT, Pourabbas R, Faramarzie M, Rahmanpour N. Comparative Study on the Efficacy of Anorganic Bovine Bone (Bio-Oss) and Nanocrystalline Hydroxyapatite (Ostim) in Maxillary Sinus Floor Augmentation. *Int Sch Res Notices*. 2014 Oct 29;2014:967091.
34. Taylor JC, Cuff SE, Leger JP, Morra A, Anderson GI. In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17: 321-330.
35. McAllister BS, Margolin MD, Cogan AG, Buck D, Hollinger JO, Lynch SE. Eighteen-month radiographic and histologic evaluation of sinus grafting with anorganic bovine bone in the chimpanzee. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 361-368.
36. Alves LC. Avaliação histomorfométrica do reparo ósseo após levantamento de soalho de seio maxilar em humanos, utilizando enxerto autógeno associado a xenógeno (BONEFILL) [dissertação]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2005. doi: 10.14393/ufu.di.2005.37
37. Maes C, Goossens S, Bartunkova S, et al. Increased skeletal VEGF enhances beta-catenin activity and results in excessively ossified bones. *EMBO J*. 2010;29(2):424–441.
38. Helmrich U, Di Maggio N, Gœuven S, et al. Osteogenic graft vascularization and bone resorption by VEGF-expressing human mesenchymal progenitors. *Biomaterials*. 2013;34(21):5025–5035.
39. Kwon TG, Zhao X, Yang Q, et al. Physical and functional interactions between Runx2 and HIF-1a induce vascular endothelial growth factor gene expression. *J Cell Biochem*. 2011;112(12):3582–3593.
40. Caubet J, Ramis JM, Ramos-Murguialday M, Morey M A, Monjo M. Gene expression and morphometric parameters of human bone biopsies after maxillary sinus floor elevation with autologous bone combined with Bio-Oss® or BoneCeramic®. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(6):727–735.
41. Zhang, L., Si, M., Shi, J., Yang, G., & Shi, Y. (2019). Evaluation of three-dimensional contraction of the volume of grafts after staged augmentation of the sinus floor, and an analysis

of influential factors. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 57(4), 323–329.
doi:10.1016/j.bjoms.2019.03.0.

Tabelas

Tabela 1. Resultado da histometria para o BoneFill, Bio-Oss e Autógeno.

Histometria			
Grupos	Biomaterial	Tecido ósseo	Tecido conjuntivo
Bonefill	2,17	61,9	34,2
Bio-Oss	14,3	34,08	51,4
Autógeno	-	53,9	46,2

Média das regiões apical, intermediário e leito expressa em %, para cada tipo de tecido.

Tabela 2. Resultado estatístico para tecido ósseo.

Comparação	P<0,05
Bonefill x Bio-Oss	Sim (p<0,002)
Bonefill x Autógeno	Não
Autógeno x Bio-Oss	Sim (p<0,022)

Tabela 3. Resultado estatístico para biomaterial remanescente.

Comparação	P<0,05
Bonefill x Bio-Oss	Sim (p<0,017)

Tabela 4. Resultado estatístico para o tecido conjuntivo medular.

Comparação	P<0,05
Bio-Oss x Autógeno	Não
Bonefill x Bio-Oss	Sim (p<0,032)
Bonefill x Autógeno	Não

Tabela 5. Resultado para as imunomarcações de VEGF, RUNX 2 e Osteocalcina.

Grupos	Imunomarcação		
	VEGF	RUNX 2	Osteocalcina
BoneFill	1	1	2
Bio-Oss	3	3	3
Autógeno	2	1	3

0 = Nenhuma marcação 1= Marcação fraca 2= Marcação moderada 3= Marcação intensa

Figuras

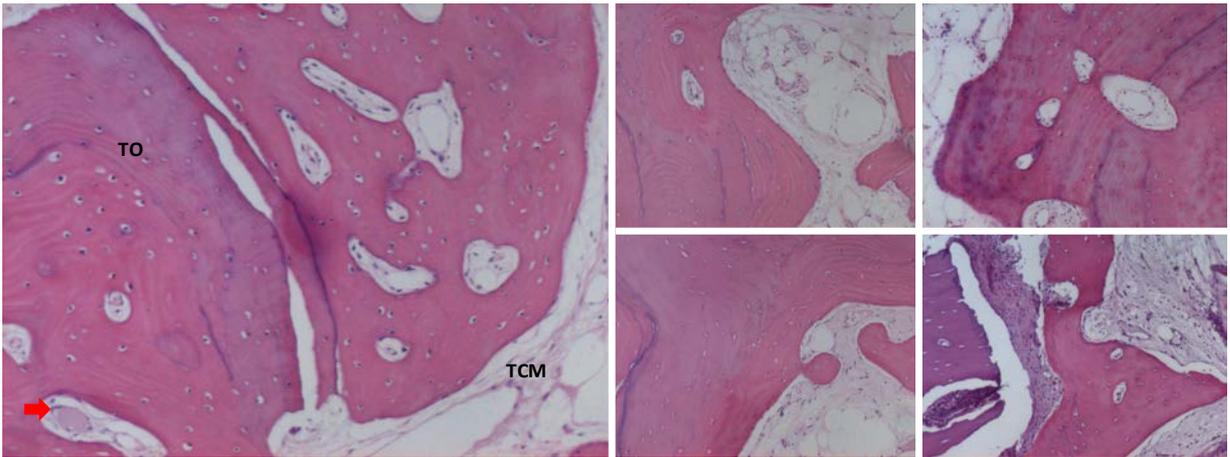


Figura 1. Aspecto histológico do Bonefill com um padrão de tecido ósseo (TO) com pouco tecido conjuntivo medular (TCM) intertrabecular foi bem característico em todos os espécimes avaliados, com pouco biomaterial (seta vermelha) remanescente em toda a área de interesse, com grande incorporação de tecido ósseo maduro pela presença de lacunas preenchidas por osteócitos. (Fotomicrografia do grupo Bonefill, aumento de 12,5x coloração Hematoxilina & Eosina)

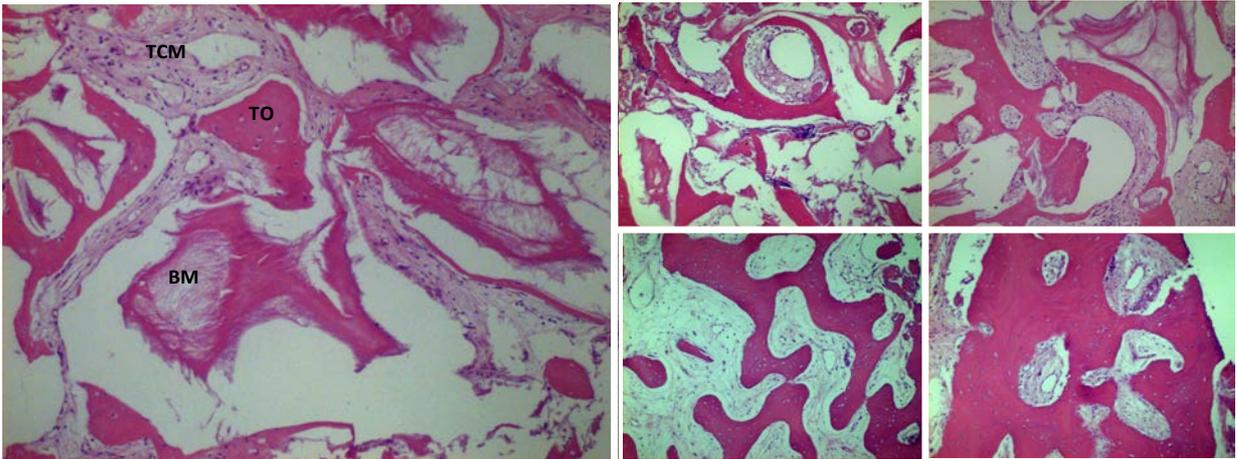


Figura 2. Para o grupo Bio-Oss foi notada a permanência de grande quantidade de partículas de biomaterial (BM) envolta por tecido ósseo (TO) neoformado e entremeado por tecido conjuntivo medular (TCM) em desenvolvimento com infiltrado inflamatório um padrão de tecido ósseo envolto por uma matriz conjuntiva não mineralizada predominou em todos os espécimes avaliados. (Fotomicrografia do grupo Bio-Oss, aumento de 12,5x coloração Hematoxilina & Eosina)

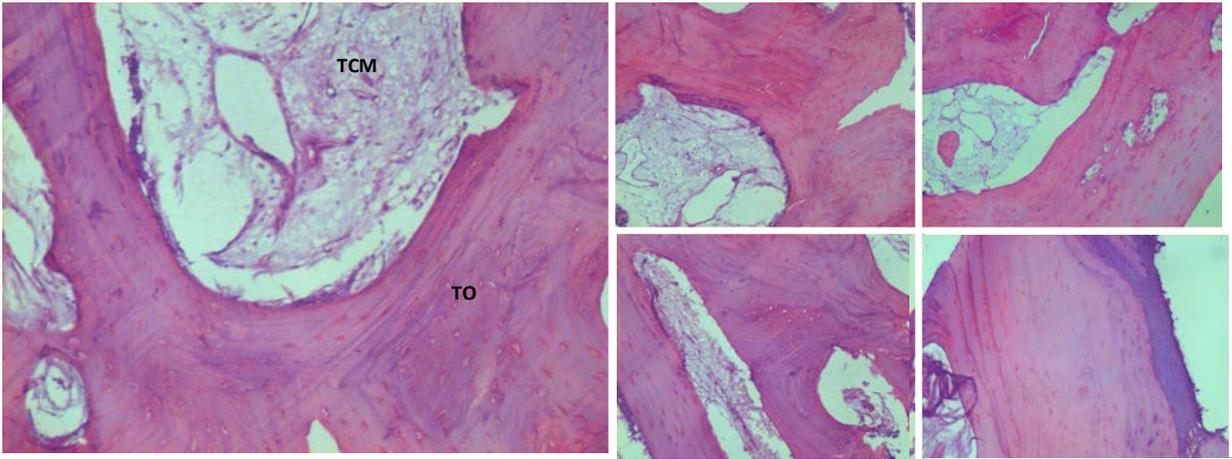


Figura 3. Analisando a histologia das imagens nota-se que o grupo autógeno apresentou formação de tecido ósseo (TO) maduro com a presença de tecido conjuntivo medular (TCM) organizado, vascularizado e apresentou grande quantidade de lacunas preenchidas por osteócitos. (Fotomicrografia do grupo autógeno, aumento de 12,5x coloração Hematoxilina & Eosina)

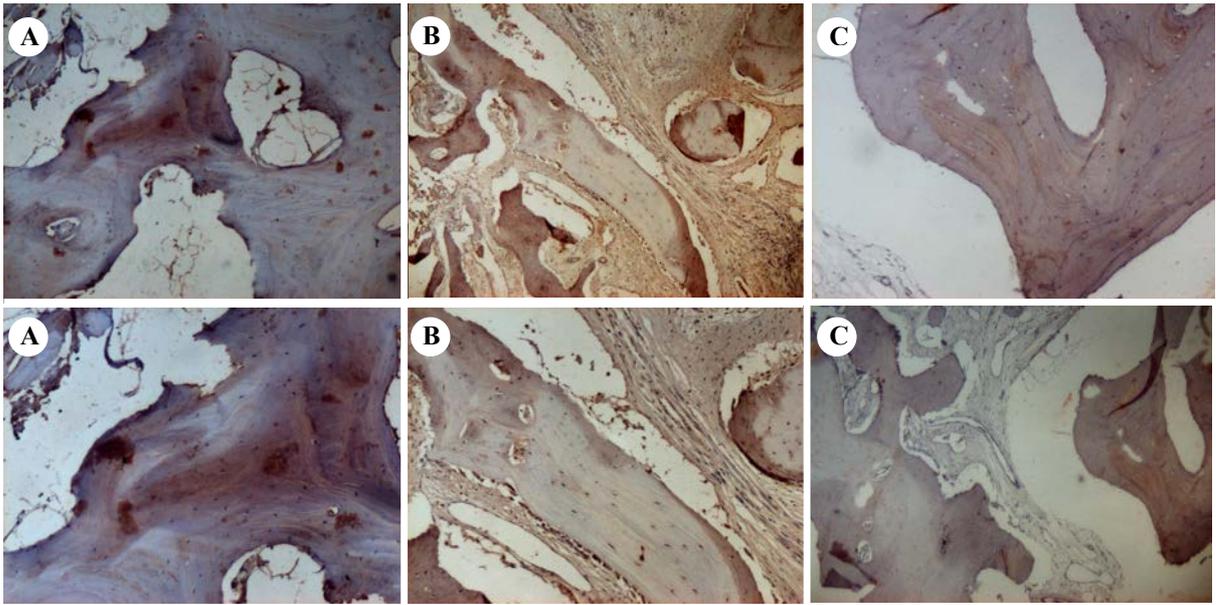


Figura 4. Padrão de imunomarcção para OCN (A) Bonefill; (B) Bio-Oss; (C) Autógeno.

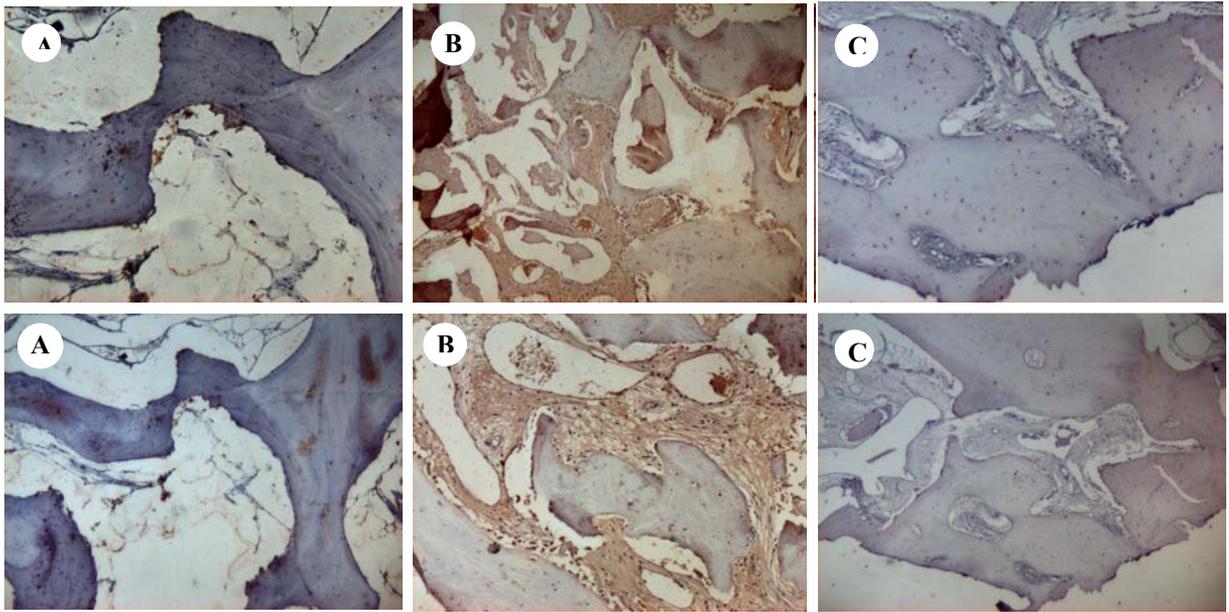


Figura 5. Padrão de imunomarcção para RUNX2 (A) Bonefill; (B) Bio-Oss; (C) Autógeno.

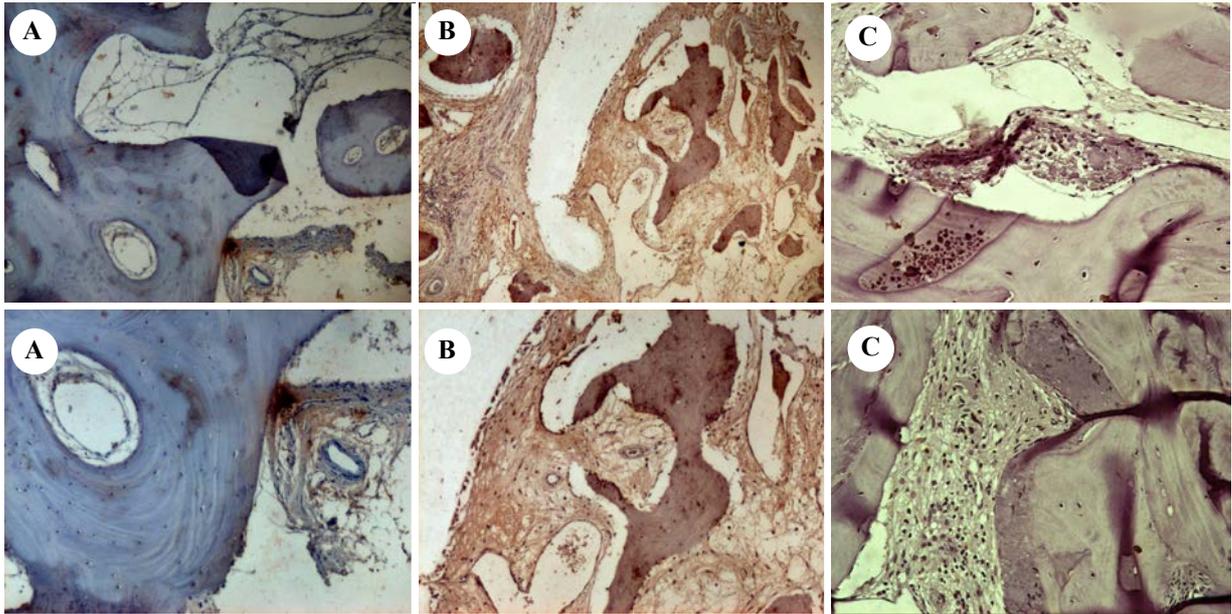
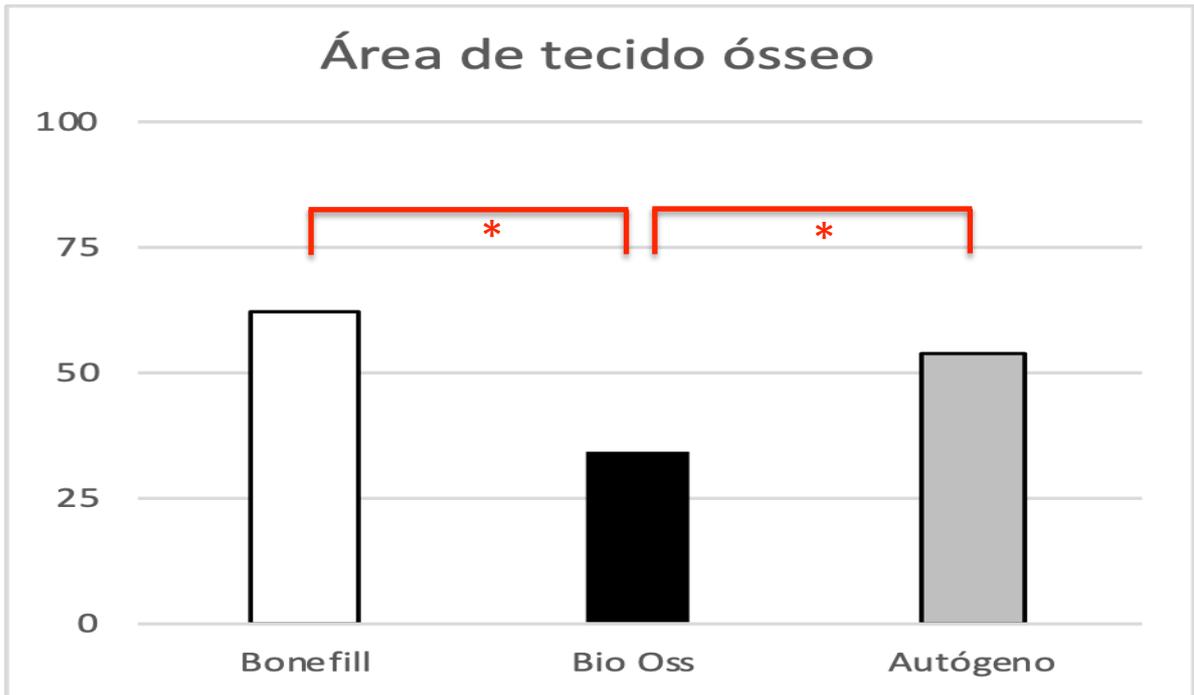


Figura 6. Padrão de imunomarcção para VEGF (A) Bonefill; (B) Bio-Oss; (C) Autógeno.

Gráficos



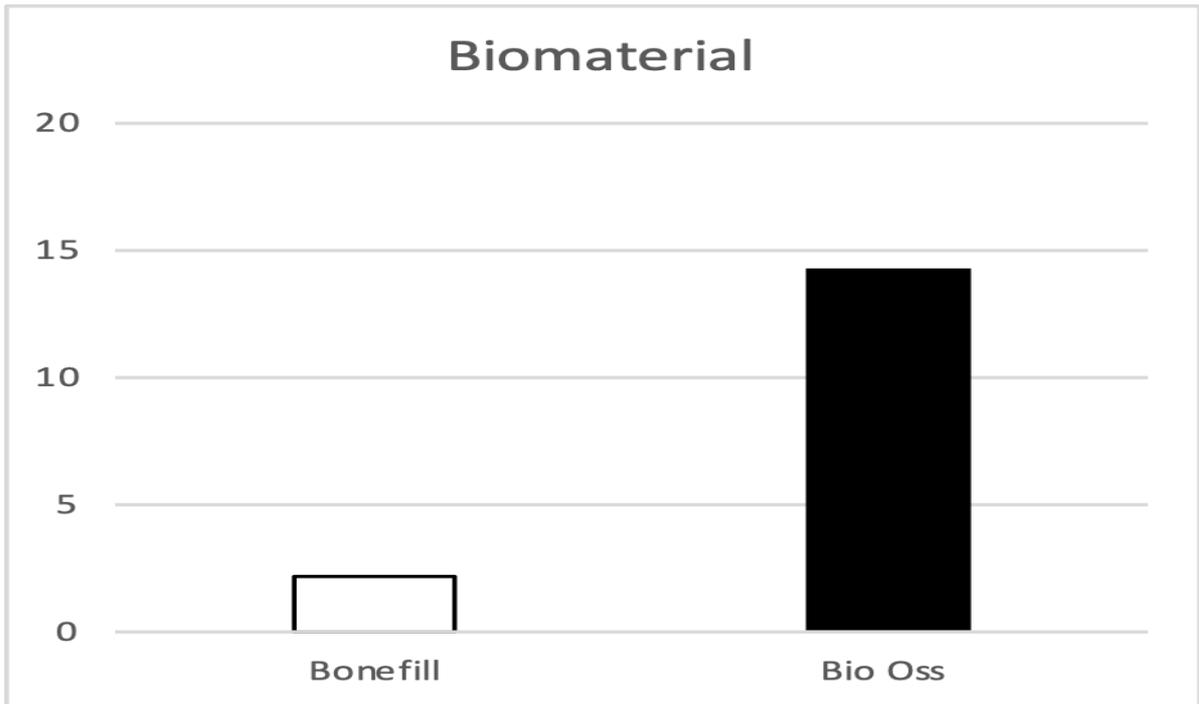


Gráfico 2. Diferença entre os grupos Bonefill e Bio-Oss.

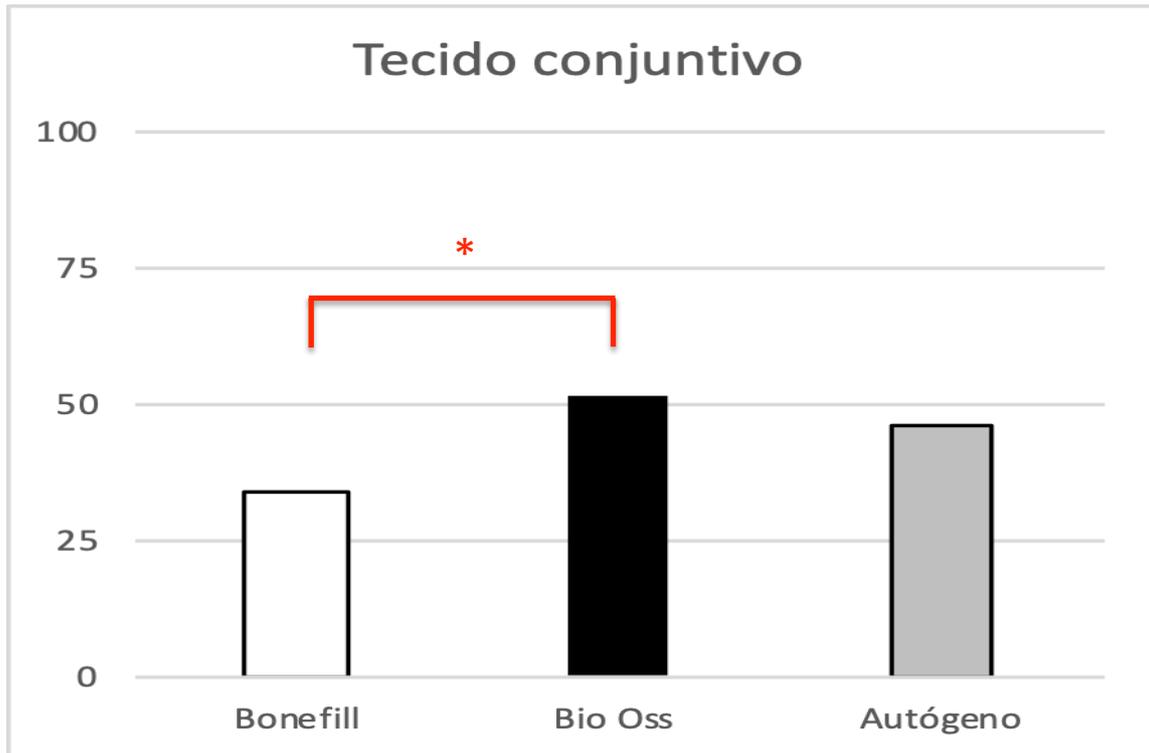


Gráfico 3. (* $p < 0,05$) identificando a diferença estatística entre os grupos.

Anexos

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo comparativo entre o Bonefill® e o Bio-Oss® na enxertia óssea de seios maxilares com elevação da membrana sinusal: análise histométrica, imunoistoquímica e micro-tomográfica (Micro-CT)

Pesquisador: Eduardo Hochuli Vieira

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 17281119.4.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.768.683

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo clínico controlado randomizado. Metodologia: 18 pacientes serão convidados para participando estudo, resultando em 18 seios enxertados devidos em 3 grupos sendo o controle o grupo autógeno controle (GAC); Grupo Bonefill® (GBF); Grupo Bio-oss® (GBO).Serão realizadas as enxertias ósseas, as biópsias serão realizadas 6 meses após arealização dos enxertos as análises serão direcionadas para histometria,imunoistoquímica para evidenciação de RUNX2, VEGF e Osteocalcina e avaliaçãomicro-tomográfica.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar através de análise histométrica, imunoistoquímica e por microtomografia computadorizada o comportamento dos biomateriais Bonefill® (BF) e doBio-Oss® (BO) osso bovino inorgânico ao osso autógeno na enxertia de seiosmaxilares de humanos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

a participação nesta pesquisa não infringe as normas

legais e éticas tendo como riscos decorrentes da cirurgia classificados como moderados, pois serão realizados procedimentos de nível ambulatorial e exames imaginológicos com finalidade de

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193
Bairro: VILA MENDONCA **CEP:** 16.015-050
UF: SP **Município:** ARACATUBA
Telefone: (18)3636-3200 **Fax:** (18)3636-3332 **E-mail:** andrebertoz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"



Continuação do Parecer: 3.768.683

diagnóstico. Para tanto, todas as medidas preventivas durante os procedimentos serão tomadas para minimizar qualquer risco ou incômodo. Contudo, infecção do seio maxilar operado, sinusites, absorção do material enxertado decorrente ou não do procedimento cirúrgico e dos cuidados pós operatórios podem ocorrer. Caso aconteça, o pesquisador tomará todas as medidas necessárias para sanar os problemas e refazer todo o procedimento. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.

Benefícios:

Não haverá nenhum benefício

direto de obter a altura óssea necessária para a instalação dos implantes dentais. Entretanto, espera-se que este estudo resulte em informações importantes sobre a forma da reparação óssea do Bonefill e do BioOss em reconstruções de seios maxilares, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa viabilizar uma alternativa para as reconstruções sinusais, onde pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos, respeitando-se o sigilo das informações coletadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Adequado as normas do CONEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomenda-se a aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Não havendo pendências, o CEP propõe a aprovação do projeto de pesquisa salientando que, de acordo com a Resolução 466 CNS de 12/12/2012 (título X, seção X.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 01/06/2020. O CEP reitera a necessidade de entrega de uma via (não cópia) do TCLE ao sujeito participante da pesquisa e solicita ao pesquisador responsável leitura da

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

**UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"**



Continuação do Parecer: 3.768.683

carta circular 003/2011 CONEP/CNS antes do início do projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1380236.pdf	28/11/2019 23:19:04		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_cristian.pdf	28/11/2019 23:18:50	Eduardo Hochuli Vieira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.docx	18/08/2019 12:37:49	Eduardo Hochuli Vieira	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	01/07/2019 21:46:19	Eduardo Hochuli Vieira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACATUBA, 13 de Dezembro de 2019

**Assinado por:
Aldiéris Alves Pesqueira
(Coordenador(a))**

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193
Bairro: VILA MENDONCA **CEP:** 16.015-050
UF: SP **Município:** ARACATUBA
Telefone: (18)3636-3200 **Fax:** (18)3636-3332 **E-mail:** andrebertoz@foa.unesp.br

ANEXO B - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO SEGUNDO O PERIÓDICO

Normas para publicação no periódico International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery

Link: <http://www.ijoms.com/content/authorinfo>

Guide for Authors

Would authors please note that the reference style for the journal has now changed. Please pay special attention to the guidelines under the heading "References" below

Authors wishing to submit their work to the journal are urged to read this detailed guide for authors and comply with all the requirements, particularly those relating to manuscript length and format. This will speed up the reviewing process and reduce the time taken to publish a paper following acceptance.

Online Submission

Submission and peer-review of all papers is now conducted entirely online, increasing efficiency for editors, authors, and reviewers, and enhancing publication speed. Authors requiring further information on online submission are strongly encouraged to view the system, including a tutorial, at <http://ees.elsevier.com/ijoms> A comprehensive Author Support service is available to answer additional enquiries at authorsupport@elsevier.com. Once a paper has been submitted, all subsequent correspondence between the Editorial Office (ijoms@elsevier.com) and the corresponding author will be by e-mail.

Editorial Policy

A paper is accepted for publication on the understanding that it has not been submitted simultaneously to another journal, has been read and approved by all authors, and that the work has not been published before. The Editors reserve the right to make editorial and literary corrections. Any opinions expressed or policies advocated do not necessarily reflect the opinions and policies of the Editors.

Declarations

Upon submission you will be required to complete and upload the declarations page (pdf version or word version) to declare funding, conflict of interest and to indicate that ethical approval was given all studies involving patients must have patient consent and ethical committee approval, please refer to the section on Ethics below. This information must also be inserted into your manuscript under the acknowledgements section with the headings below. Upon submission you will be required to complete and upload this form (pdf version or word version) to declare funding, conflict of interest, and to indicate whether ethical approval and patient consent were given. Lastly you must confirm that all authors have agreed to the submission.

PLEASE NOTE that all funding must be declared at first submission, as the addition of funding at acceptance stage may invalidate the acceptance of your manuscript.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content (3) final approval of the version to be submitted.

Normally one or two, and no more than three, authors should appear on a short communication, technical note or interesting case/lesson learnt. Full length articles may contain as many authors as appropriate. Minor contributors and non-contributory clinicians who have allowed their patients to be used in the paper should be acknowledged at the end of the text and before the references.

The corresponding author is responsible for ensuring that all authors are aware of their obligations.

Before a paper is accepted all the authors of the paper must sign the Confirmation of Authorship form. This form confirms that all the named authors agree to publication if the paper is accepted and that each has had significant input into the paper. Please download the form and send it to the Editorial Office. (pdf version or word version) It is advisable that to prevent delay this form is submitted early in the editorial process.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the main text, all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If an author has no conflict of interest to declare, this should be stated.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Ethics

Any manuscript concerned with human subjects, medical records, or human tissue that is submitted to the International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery should comply with the principles stated in the Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, and as amended most recently by the 64th World Medical Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013. The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate Ethical Committee related to the institution(s) in which the work was performed, and that subjects gave informed consent to the work. The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery requires institutional Ethics Committee approval for all human studies. For retrospective studies of records either a statement of approval or a statement of exemption from the

Committee is appropriate. This statement should be provided upon submission of the manuscript.

Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines.

Patient confidentiality

Patients have a right to privacy. Therefore identifying information, including patients' images, names, initials, or hospital numbers, should not be included in videos, recordings, written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and you have obtained written informed consent for publication in print and electronic form from the patient (or parent, guardian or next of kin where applicable). If such consent is made subject to any conditions, The Editor and Publisher must be made aware of all such conditions. Written consents must be provided to the Editorial Office on request. Even where consent has been given, identifying details should be omitted if they are not essential. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note. *If consent for publication has not been obtained, personal details of patients included in any part of the paper and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.*

Language Editing Services

Papers will only be accepted when they are written in an acceptable standard of English. Authors, particularly those whose first language is not English, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission should visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note, Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions.

Article Types

The following contributions will be accepted for publication. *Please take careful note of the maximum length where applicable.* Overlength articles will be returned to the authors without peer review:

- editorials (commissioned by the editor)
- clinical papers: no more than 5000 words and 30 references
- research papers: no more than 6000 words and 40 references
- review papers - no limit on length or number of references
- technical notes (surgical techniques, new instruments, technical innovations) - no more than 2000 words, 10 references and 4 figures
- case reports - no more than 2000 words, 10 references and 2 figures
- book reviews
- letters to the editor - please see detailed guidelines provided at the end of the main guide for authors
- IAOMS announcements
- general announcements.

Please note: Case reports will be considered for publication only if they add new information to the existing body of knowledge or present new points of view on known diseases.

All authors must have contributed to the paper, not necessarily the patient treatment. Technical notes and case reports are limited to a maximum of 4 authors, in exceptional circumstances, 5.

Criteria for Publication

Papers that will be considered for publication should be: • focused

- based on a sound hypothesis and an adequate investigation method analysing a statistically relevant series, leading to relevant results that back the conclusion
- well written in simple, scientific English grammar and style
- presented with a clear message and containing new information that is relevant for the readership of the journal
- Note the comment above relating to case reports.

Following peer-review, authors are required to resubmit their revised paper within **3 months**; in exceptional circumstances, this timeline may be extended at the editor's discretion.

Presentation of Manuscripts

General points

Papers should be submitted in journal style. Failure to do so will result in the paper being immediately returned to the author and may lead to significant delays in publication. Spelling may follow British or American usage, but not a mixture of the two. Papers should be double-spaced with a margin of at least 3 cm all round. Each line must be numbered.

Format

Observational or Case Cohort Studies, as well as Case Series must be presented in conformance with STROBE guidelines: www.strobe-statement.org

Randomized Controlled Trials must be presented in conformance with CONSORT guidelines: www.consort-statement.org

Systematic Reviews and Meta-Analyses must be presented according to PRISMA guidelines: www.prisma-statement.org

Papers should be set out as follows, with each section beginning on a separate page: • title page

- abstract
- text
- acknowledgements
- references
- tables
- captions to illustrations.

Please note that the qualifications of the authors will not be included in the published paper and should not be listed anywhere on the manuscript.

Title page

The title page should give the following information: • title of the article

- full name of each author
- name and address of the department or institution to which the work should be attributed
- name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author responsible for correspondence and to whom requests for offprints should be sent
- sources of support in the form of grants
- key words.

If the title is longer than 40 characters (including spaces), a short title should be supplied for use in the running heads.

Abstract

200 words maximum. Do not use subheadings or abbreviations; write as a continuous paragraph. Must contain all relevant information, including results and conclusion.

Text

Please ensure that the text of your paper conforms to the following structure: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion. There is no separate Conclusion section. There should be no mention of the institution where the work was carried out, especially in the Materials and Methods section.

Introduction

- Present first the nature and scope of the problem investigated
- Review briefly the pertinent literature
- State the rationale for the study
- Explain the purpose in writing the paper
- State the method of investigation and the reasons for the choice of a particular method
- ; Should be written in the present tense

Materials and Methods

- Give the full details, limit references
- Should be written in the past tense
- Include exact technical specifications, quantities and generic names
- Limit the number of subheadings, and use the same in the results section
- Mention statistical method
- Do not include results in this section

Results

- Do not describe methods
- Present results in the past tense
- Present representations rather than endlessly repetitive data
- Use tables where appropriate, and do not repeat information in the text

Discussion

- Discuss - do not recapitulate results
- Point out exceptions and lack of correlations. Do not try to cover up or 'fudge' data
- Show how results agree/contrast with previous work
- Discuss the implications of your findings
- State your conclusions very clearly

Headings: Headings enhance readability but should be appropriate to the nature of the paper.

They should be kept to a minimum and may be removed by the Editors. Normally only two categories of headings should be used: major ones should be typed in capital letters; minor ones should be typed in lower case (with an initial capital letter) at the left hand margin.

Quantitative analysis: If any statistical methods are used, the text should state the test or other analytical method applied, basic descriptive statistics, critical value obtained, degrees of freedom, and significance level, e.g. (ANOVA, $F=2.34$; $df=3,46$; $P<0.001$). If a computer data analysis was involved, the software package should be mentioned. Descriptive statistics may be presented in the form of a table, or included in the text.

Abbreviations, symbols, and nomenclature: Only standardized terms, which have been generally accepted, should be used. Unfamiliar abbreviations must be defined when first used. For further details concerning abbreviations, see Baron DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors, London, Royal Society of Medicine, 1988 (available from The Royal Society of Medicine Services, 1 Wimpole Street, London W1M 8AE, UK).

The minus sign should be -.

If a special designation for teeth is used, a note should explain the symbols. Scientific names of organisms should be binomials, the generic name only with a capital, and should be italicised in the typescript. Microorganisms should be named according to the latest edition of the Manual of Clinical Microbiology, American Society of Microbiology.

Drugs: use only generic (non-proprietary) names in the text. Suppliers of drugs used may be named in the Acknowledgments section. Do not use 'he', 'his' etc where the sex of the person is unknown; say 'the patient' etc. Avoid inelegant alternatives such as 'he/she'. Patients should not be automatically designated as 'she', and doctors as 'he'.

References

The journal's reference style has changed. References should be numbered consecutively throughout the article, beginning with 1 for the first-cited reference. References should be listed at the end of the paper in the order in which they appear in the text (not listed alphabetically by author and numbered as previously).

The accuracy of references is the responsibility of the author. References in the text should be numbered with superscript numerals inside punctuation: for example "Kenneth and Cohen¹⁴ showed..."; "each technique has advantages and disadvantages⁵⁻¹³." Citations in the text to papers with more than two authors should give the name of the first author followed by "et al."; for example: "Wang et al³⁷ identified..."

All references cited in the text must be included in the list of references at the end of the paper. Each reference listed must include the names of all authors. Please see section "Article Types" for guidance on the maximum number of reference for each type of article.

Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus (see www.nlm.nih.gov) . When citing papers from monographs and books, give the author, title of chapter, editor of book, title of book, publisher, place and year of publication, first and last page numbers. Internet pages and online resources may be included within the text and should state as a minimum the author(s), title and full URL. The date of access should be supplied and all URLs should be checked again at proof stage.

Examples:

Journal article: Halsband ER, Hirshberg YA, Berg LI. Ketamine hydrochloride in outpatient oral surgery. *J Oral Surg* 1971; 29: 472-476.

When citing a paper which has a Digital Object Identifier (DOI), use the following style: Toschka H, Feifel H. Aesthetic and functional results of harvesting radial forearm flap. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001; 30: 45-51. doi: 10.1054/ijom.2000.0005

Book/monograph: Costich ER, White RP. Fundamentals of oral surgery. Philadelphia: WB Saunders, 1971: 201-220.

Book chapter: Hodge HC, Smith FA. Biological properties of inorganic fluorides. In: Simons JH, ed.: Fluorine chemistry. New York: Academic Press, 1965: 135.

Internet resource: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. <http://www.icmje.org> [Accessibility verified March 21, 2008]

Tables

Tables should be used only to clarify important points. Double documentation in the form of tables and figures is not acceptable. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. They should be double spaced on separate pages and contain only horizontal rules. Do not submit tables as photographs. A short descriptive title should appear above each table, with any footnotes suitably identified below. Care must be taken to ensure that all units are included. Ensure that each table is cited in the text.

Figures

All illustrations (e.g. graphs, drawings or photographs) are considered to be figures, and should be numbered in sequence with Arabic numerals. Each figure should have a caption, typed double-spaced on a separate page and numbered correspondingly. **The minimum resolution for electronically generated figures is 300 dpi.**

Line illustrations: All line illustrations should present a crisp black image on an even white background (127 x 178 mm (5 x 7 in), or no larger than 203 x 254 mm (8 x 10 in). The size of the lettering should be appropriate, taking into account the necessary size reduction.

Photographs and radiographs: Photomicrographs should show magnification and details of any staining techniques used. **The area(s) of interest must be clearly indicated with arrows or other symbols.**

Colour images are encouraged, but the decision whether an illustration is accepted for reproduction in colour in the printed journal lies with the editor-in-chief. Figures supplied in colour will appear in colour in the online version of the journal.

Size of photographs: The final size of photographs will be: (a) single column width (53 mm), (b) double column width (110 mm), (c) full page width (170 mm). Photographs should ideally be submitted at the final reproduction size based on the above figures.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, which they are requested to correct and return within **48 hours**. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author will be provided, at no cost, with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Accepted Articles

For the facility to track accepted articles and set email alerts to inform you of when an article's status has changed, visit: <http://authors.elsevier.com/TrackPaper.html> There are also detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those related to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Instructions for Letters to the Editor

The IJOMS welcomes Letters to the Editor. To facilitate submission of the highest quality of Letters to the Editor, the following guidelines should be followed:

1. Letters are meant to be focus pieces and, therefore, are limited to no more than 600 words, 6 references and a maximum of 2 figures. One reference should include a reference to the IJOMS article being addressed.
2. It is recommended that you limit your letter to one or two important and critical points to which you wish to provide a clear and precise discussion regarding the previously published article.

3. One should support all assertion by peer review literature which should be a primary research or large clinical studies rather than a case report.
4. Please include any financial disclosures at the end of the letter. This would include the potential conflicts of interest not just related to the specific content of your letter but also the content of the IJOMS article and other related areas.
5. Please recognize that letters that are essentially in agreement with the author's findings and offer no additional insights provide little new information for publication. Likewise, letters that highlight the writer's own research or are otherwise self promotional will receive a low publication priority.
6. There may be a need for additional editing. Should editing be required the letter will be sent back to the author for final approval of the edited version.
7. It is important to use civil and professional discourse. It is not advisable that one adopt a tone that may be misconstrued to be in anyway insulting.
8. Finally, it is not advisable to provide a letter that is anecdotal. While personal experiences can have great value in patient care, it is generally not strong evidence to be placed in a letter to the editor.