



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE SAÚDE E BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PERIODONTIA**

**ANTONIO ELIAS MANSUR**

**ENXERTO ÓSSEO ALÓGENO TIBIAL E PLASMA RICO EM PLAQUETAS  
EM SEIO MAXILAR. ESTUDO HISTOLÓGICO EM HUMANOS**

**CURITIBA**

**2014**

**ANTONIO ELIAS MANSUR**

**ENXERTO ÓSSEO ALÓGENO TIBIAL E PLASMA RICO EM PLAQUETAS  
EM SEIO MAXILAR. ESTUDO HISTOLÓGICO EM HUMANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Sung Hyun Kim

**CURITIBA**

**2014**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central

M289e  
2014 Mansur, Antonio Elias  
Enxerto ósseo alógeno tibial e plasma rico em plaquetas em seio maxilar.  
Estudo histológico em humanos / Antonio Elias Mansur ; orientador, Sung  
Hyun Kim. – 2014.  
74 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,  
2014

Inclui bibliografias  
Texto em português e inglês

1. Odontologia. 2. Periodontia. 3. Ossos - Enxerto. 4. Alenxertos. 5. Seio  
maxilar. I. Sung, Hyun Kim. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.6



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Escola de Saúde e Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

## TERMO DE APROVAÇÃO

**ANTONIO ELIAS MANSUR**

ENXERTO ÓSSEO ALÓGENO FRESCO CONGELADO PARTICULADO ASSOCIADO OU  
NÃO AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO LEVANTAMENTO DO SEIO MAXILAR.  
ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOMÉTRICO EM HUMANOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Periodontia**.

Orientador (a):

Prof Dr. Sung Hyun Kim  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof Dr. Vinicius Augusto Tramontina  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sonia Mara Luczyszyn  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Eduardo Saba-Chuffi  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, SLMandic

Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR

Curitiba, 01 de setembro de 2014.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela oportunidade única desta realização pessoal e profissional.

À minha esposa, Maria Cristina, razão e amor de toda minha vida.

Ao meu filho Alexandre E. Contin Mansur pelo companheirismo e orgulho.

À minha filha Michele E. C. Mansur e Luiz Eduardo e aos meus netos Rafael e Eduardo, pelo apoio durante a trajetória da realização desta pesquisa.

Ao meu filho Elias C. Mansur e Cintya Branco, pelo apoio profissional na realização deste trabalho.

Ao Dr. Sérgio Vieira pela abertura da Pós-Graduação PUC-PR.

Ao orientador Prof. Dr. Sung Hyun kim, pela dedicação, e companheirismo na ajuda e disponibilidade durante todo o trabalho.

Aos Professores Dr. Vinicius Augusto Tramontina, Dr<sup>a</sup>. Sônia Mara Luczyszyn, Dr<sup>a</sup>. Vula Papalexiou, pelo apoio ao grupo de trabalho.

Ao Professor Sergio Aparecido Ignácio pelo companheirismo na realização da Estatística.

À Professora Lucia Noronha pelos ensinamentos na análise das imagens.

Ao Seigo e Ana Paula pelo apoio na microscopia e captura de imagens.

Aos meus amigos Alexandre Molinari e César Thomé pela companhia durante todo o curso.

À funcionária Eliane Silva, pela colaboração para que realização deste trabalho.

Às funcionárias PUC-PR, Sra Neide Reis Borges e Flávia Beuting, meus agradecimentos de coração pelo apoio sempre que necessário.

Ao Curso de Especialização de Implantodontia, EAP-ABO-PONTA GROSSA, Alexandre Kugler, à UEPG, à PUC-PR e a Driller, Kopp, Titanium Fix e Neodent por todo suporte e abertura de possibilidades para a conclusão deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>ARTIGO EM PORTUGUÊS .....</b>	<b>6</b>
INTRODUÇÃO .....	8
MATERIAL E MÉTODO .....	11
RESULTADOS .....	14
DISCUSSÃO .....	16
CONCLUSÃO.....	19
REFERÊNCIAS.....	19
<b>ARTIGO EM INGLÊS.....</b>	<b>34</b>
INTRODUCTION.....	36
MATERIAL AND METHOD .....	37
RESULTS.....	40
DISCUSSION.....	41
CONCLUSION .....	43
REFERENCES.....	44
<b>ANEXO A – PARECER DE COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO C – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO D – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>68</b>

## ARTIGO EM PORTUGUÊS

Enxerto ósseo alógeno tibial e plasma rico em plaquetas em seio maxilar. Estudo histológico em humanos.

Antonio Elias Mansur, DDS; MSc<sup>a</sup>

Sung Hyun Kim, DDS; MSc; PhD<sup>b</sup>

a. Aluno do programa de pós-graduação em Odontologia, Escola de Saúde e Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

b. Professor do programa de pós-graduação em Odontologia, Escola de Saúde e Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Correspondence to:

Prof. Dr. Sung Hyun Kim, Curso de Odontologia, PUCPR

Rua Imaculada Conceição, 1155 ZIP 80215-901 Curitiba – Paraná Brazil

e-mail: [sung.kim@pucpr.br](mailto:sung.kim@pucpr.br)



## RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a reparação óssea após o levantamento do seio maxilar com aloenxerto associado ou não ao plasma rico em plaquetas (PRP). Seis pacientes adultos, do sexo feminino, com ausência bilateral dos dentes posteriores superiores e com o rebordo residual de 1 a 4 mm foram incluídos na amostra. As pacientes foram submetidas aos procedimentos bilaterais de levantamento dos seios maxilares com enxerto ósseo alógeno fresco particulado. Em um dos lados, foi somente com aloenxerto, Grupo 1; enquanto que no lado contralateral foi com a aglutinação do PRP ao aloenxerto, Grupo 2. Nos períodos de 6 e 9 meses subsequentes foram realizadas biópsias ósseas no sentido cérvico-apical para avaliação histológica e histométrica da reparação óssea. Para a análise histométrica da reparação óssea, os cortes histológicos foram corados em tricrômio de Masson e as imagens nas áreas cervical, médio e apical foram analisadas por meio de um programa de imagem. Os resultados mostraram que a área total do osso variou de  $34,42 \pm 13,55$  % em 6 meses e  $41,76 \pm 13,34$  % em 9 meses para o grupo 1, e  $41,55 \pm 14,92$  % em 6 meses e  $40,64 \pm 11,96$  % em 9 meses para o grupo 2. Os valores médios das variáveis em porcentagem foram analisados com o teste paramétrico *t* de student para amostras dependentes e independentes, e não houve diferença estatística entre elas. O enxerto ósseo alógeno fresco particulado no seio maxilar promoveu a reparação do osso trabecular independentemente da associação ao PRP.

**Palavras-chaves:** Enxerto alógeno. Homoenxerto. Levantamento do seio maxilar. Plasma rico em plaquetas.

## INTRODUÇÃO

Rebordos alveolares severamente reabsorvidos após a perda de dentes posteriores na maxila e a pneumatização do seio maxilar podem levar a um quadro de insuficiência óssea para a reabilitação com implantes osseointegrados.<sup>1,2</sup> Além disso, uma menor densidade encontrada nessa região, a qual se agrava com o avanço da idade, também pode agir como fator adicional para uma menor taxa de sucesso com implantes osseointegrados.<sup>3-5</sup> Entretanto, apesar do trauma cirúrgico, o procedimento de levantamento do seio maxilar associado aos enxertos ósseos tem sido uma opção terapêutica, uma alternativa para solucionar tais adversidades e preparar para inserção de implantes osseointegrados na região posterior de maxila. A efetividade deste procedimento tem sido avaliada por diversos estudos clínicos, radiográficos e histológicos de curta e longa duração.<sup>6-11</sup> Os enxertos ósseos autógenos intra e extrabuais têm sido usados em cirurgias reconstrutivas. Eles são considerados como material de enxerto ósseo ideal porque são os únicos a fornecer células ósseas vivas, imunocompatíveis e essenciais a primeira fase da osteogênese. O osso autógeno, com suas propriedades biológicas e osteogênicas, é considerado padrão ouro para este tipo de procedimento.<sup>12-14</sup> Entretanto, a necessidade de um segundo sítio cirúrgico pode representar, além do trauma cirúrgico, morbidade e riscos maiores para o paciente. Assim sendo, diversos substitutos ósseos no seio maxilar para ganho ósseo tem sido aplicados,<sup>15-17</sup> Dentre vários materiais, o osso alógeno tem sido uma opção em procedimentos para expansão de volume ósseo na maxila e na mandíbula para futura inserção de implantes osseointegrados.<sup>18-22</sup> O uso desse material tem algumas vantagens adicionais que incluem uma pronta disponibilidade de grande quantidade de material e baixo potencial de antigenicidade do mesmo. Ainda, com as normas rigorosas na

obtenção, processamento eficiente e seguro dos órgãos, o risco de contaminação e transmissão de doenças torna-se desprezível. Embora não possua as propriedades osteogênicas, o osso alógeno apresenta atividade osteocondutora e também pode ser osteoindutor devido à resposta imunocompatível promovida entre o enxerto e o hospedeiro.<sup>23-27</sup> O enxerto alógeno pode provir tanto de cadáveres quanto de seres vivos que por diferentes razões foram submetidos a amputações terapêuticas e pode ser coletado da crista ilíaca, fêmur, tíbia, úmero, costelas, vértebras e calota craniana. O material livre de tecidos moles é armazenado fresco e congelado a uma temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , diminuindo assim a sua antigenicidade.<sup>28,29</sup> Além disso, devido à resistência para reabsorção, um volume expressivo pode ser mantido por mais tempo durante o período de reparação, e não há eventos teciduais que indiquem rejeição no sítio receptor. Deste modo, este material tem sido indicado para reconstruções dos maxilares. Os aloenxertos sofrem alterações biológicas que são qualitativamente semelhantes ao enxerto autógeno. Existem semelhanças na seqüência de eventos histológicos no processo de incorporação de aloenxertos congelados ao dos enxertos autógenos. Apesar disso, o mecanismo de reparação óssea junto ao leito receptor parece ser mais lento, provavelmente menos completo e com uma união desigual do material de enxerto ao tecido receptor, especialmente quando o enxerto é em forma de bloco.<sup>23</sup> Ainda assim, a perda do potencial biológico dos mesmos pode ser bem aceita por evitar morbidade no sítio doador e por sua disponibilidade em quantidade. Porém, quando são aplicados os processos de liofilização ou esterilização do material, podem prejudicar significativamente as propriedades do enxerto ósseo.<sup>30,31</sup>

Adicionalmente, tem sido relatado que a ativação e liberação dos fatores de crescimento junto ao enxerto ósseo podem promover a diferenciação osteoblástica e

induzir a regeneração óssea.<sup>32-34</sup> Entre as várias fontes, o plasma rico em plaquetas (PRP) é considerado uma das mais importantes para os fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento de transformação, fator de crescimento semelhante à insulina e fator de crescimento endotelial vascular. A hipótese básica do plasma rico em plaquetas, como aglutinante dos enxertos ósseos com a alta concentração de plaquetas numa ferida óssea, é de que poderia aumentar a concentração local de fatores de crescimento para acelerar o processo de cura da ferida. Deste modo, vários estudos relataram que o PRP isoladamente ou associado à enxertia óssea pode melhorar significativamente a reparação óssea.<sup>35-40</sup> Apesar disso, em um relato clínico com a adição do PRP aos enxertos de osso bovino inorgânico em seios maxilares humanos não mostrou diferença significativa na formação de osso vital.<sup>41</sup> Em um outro estudo histomorfométrico em humanos com a utilização do PRP associado ao enxerto ósseo autógeno em seios maxilares, também não foi encontrada diferença significativa.<sup>42</sup> Igualmente, em um outro relato experimental em coelhos, a associação do PRP ao osso mineralizado e desmineralizado não melhorou a formação óssea em defeitos ósseos.<sup>43</sup>

Apesar dos resultados dos estudos prévios serem conflitantes no que tange à formação óssea, parece ser pertinente avaliar a importância na utilização do PRP em associação ao aloenxertos. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a reparação óssea nos seios maxilares com enxerto ósseo alógeno fresco congelado particulado associado ou não ao PRP.

## MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo incluiu seis pacientes adultos do sexo feminino com idade média de 54 anos. Como critério de inclusão as pacientes deveriam ser saudáveis e apresentar ausência bilateral dos dentes pré-molares e molares superiores ou edêntulos totais superiores, e os rebordos residuais de 1 a 4 mm de altura. Foram excluídas as pacientes com doenças sistêmicas, fumantes, gestantes e usuárias de medicação contínua.

Todas as participantes foram informadas sobre a necessidade de enxerto ósseo e cirurgia de levantamento do seio maxilar para a reabilitação com implantes osseointegrados e todas as informações como vantagens e desvantagens dos tratamentos foram abordadas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual de Ponta Grossa, protocolo nº 18068/10.

As pacientes foram submetidas aos procedimentos de levantamento bilateral de seios maxilares que, no mesmo ato cirúrgico, foi associado à enxertia óssea alógena. Como grupo 1, em um dos lados foi realizado somente o enxerto ósseo alógeno fresco particulado e contralateralmente, como grupo 2, foi com a aglutinação do PRP às partículas ósseas. A escolha do procedimento foi aleatória.

Inicialmente foi realizada a antissepsia extrabucal e intrabucal com clorexidina 2% e 0,12% respectivamente, e os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia infiltrativa local com Mepivacaína HCl a 2% e com epinefrina 1:100.000 (DFL, Rio de Janeiro, Brasil). Após a anestesia, foram realizadas as incisões na crista do rebordo alveolar a partir da tuberosidade até a região do canino e relaxantes verticais anterior e posterior com a lâmina nº15 (Sovereign, Paramount, India), depois disso foi realizado o levantamento do retalho total com um descolador

Molt (Hu-friedy, Chicago, USA) de toda a região da parede do seio maxilar por vestibular. Em seguida, utilizando a técnica piezoelétrica, foi realizada a osteotomia anatômica de toda parede vestibular em forma trapezoidal seguindo a conformação do seio maxilar<sup>44</sup> (Driller, São Paulo, Brasil). O descolamento suave e cuidadoso da membrana Schneideriana para dentro e para cima da cavidade do seio maxilar com a manutenção da integridade foi realizado com um conjunto de curetas para o levantamento de seio (Neodent, Curitiba, Brasil). A janela óssea abrangeu toda a extensão da anatomia do seio para melhor preenchimento e retenção do material de enxerto ósseo. Para cada paciente foi adquirido um bloco de 20 x 30 mm de osso alógeno fresco congelado de tíbia junto ao Banco de Tecidos Músculo-Esquelético do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Fig. 1). O bloco de osso tibial foi, inicialmente, particulado com moedor ósseo tipo pilão (MOPI, Kopp, Curitiba, Brasil) e em seguida triturado com moedor ósseo manual (MOM, Kopp, Curitiba, Brasil) para a obtenção final do tamanho das partículas ósseas de 2 a 4 mm (Fig. 2).

As cavidades nos seios maxilares foram preenchidas completamente pelo osso alógeno particulado e triturado. No lado grupo 1, houve a inserção gradual e firme das partículas ósseas para dentro da cavidade sinusal até o preenchimento completo utilizando o calcador do kit de curetas para o levantamento de seio (Neodent, Curitiba, Brasil) (Fig. 3). No lado grupo 2, foi preenchida com o osso alógeno particulado e triturado aglutinado ao PRP. Nenhuma membrana para a cobertura da área enxertada foi utilizada e o fechamento do retalho foi realizado com o fio mononylon 4-0 (Techsuture, Bauru, Brasil).

A preparação e obtenção do PRP foi a partir da coleta de 20 ml de sangue venoso uma hora antes da cirurgia. O sangue coletado foi acondicionado em 4 tubos

de ensaios de 5 mL contendo 0,5 mL de citrato de sódio a 10% como anticoagulante. Os tubos foram centrifugados por 8 minutos com velocidade de 1800 rpm (Prevasc, DCS-16 – RV, Joinville, Brasil), para a separação de glóbulos vermelhos, plasma rico em fatores de crescimento e plasma pobre em fatores de crescimento.<sup>34</sup> A camada do plasma rico em fatores de crescimento foi coletada utilizando uma micropipeta e a camada superior do plasma pobre em plaquetas foi descartada. Após a obtenção do plasma, adicionou-se a solução de cloreto de cálcio a 10% para a gelificação em um recipiente de vidro. Em seguida, as partículas ósseas trituradas foram aglutinadas ao PRP (Fig. 4). Como medicação pré-operatória administraram-se 4 mg de dexametasona (Decadron, São Paulo, Brasil) por via oral 1 hora antes da cirurgia. No pós-operatório, foram prescritas a amoxicilina 500mg de 8 em 8 horas por 7 dias (Amoxil, Medley, São Paulo, Brasil), ibuprofeno 600 mg a cada 12 horas por 3 dias (Ibuprofeno, EMS, São Paulo, Brasil), além do enxaguatório bucal com digluconato de clorexidina 0,12%, 2 vezes ao dia. Não houve intercorrências em nenhum dos pacientes durante o período pós-operatório de 2 semanas.

Nos períodos de 6 e 9 meses após a cirurgia, foram realizadas biópsias ósseas no sentido cérvico-apical do rebordo, em diferentes sítios, utilizando uma broca trefina de 3.0 x 10 mm (Neodent, Curitiba, Brasil) para avaliação histológica (Fig. 5). Os núcleos ósseos coletados com a broca trefina foram mantidos em solução de formol tamponado a 10% para a preparação laboratorial. As peças foram submetidas ao processo de descalcificação em solução de ácido fórmico a 5% e, em seguida, foram incluídas em parafina de forma que permitissem a microtomia no sentido do longo eixo das mesmas. De cada peça foram obtidos 6 cortes histológicos

da região central com espessura de 6  $\mu\text{m}$ . Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e com tricrômico de Masson.

Para a análise histométrica do osso alveolar, a partir dos cortes histológicos corados em tricrômio de Masson, foram capturadas para cada corte 3 imagens nas áreas correspondentes às regiões superficial, média e profunda por meio de uma câmera de vídeo (Dino-Eye USB camera, Dino-Lite, USA) acoplada a um microscópio de luz com o aumento de 40 vezes. As imagens capturadas foram analisadas por meio de programa Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics, USA) para a quantificação das áreas de osso alógeno residual, osso em neoformação e tecido conjuntivo. Para a avaliação destas áreas, inicialmente, confeccionou-se uma máscara padrão com codificação em cores para cada uma das três estruturas no Image-Pro Plus. Em seguida, a máscara padrão foi aplicada em todas as imagens capturadas com calibração prévia em micrômetro para a mensuração das áreas (Fig. 6).

## RESULTADOS

A formação óssea nas áreas submetidas aos procedimentos de enxerto ósseo alógeno associado ao levantamento do seio maxilar foi observada nas radiografias panorâmicas nos períodos de 6 e de 9 meses. Os cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina revelaram resultados semelhantes nas amostras de 6 meses para ambos os grupos. Na maioria deles havia fragmentos de aloenxerto contendo trabéculas de tecido ósseo com aspecto de vitalidade e outras sem vitalidade. Na região medular ao redor do tecido ósseo havia a presença de células adiposas, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Ao redor do tecido ósseo não vital havia a presença de áreas de aspecto basofílico e de tecido conjuntivo fibroso com indícios



de início de mineralização por substituição e, havia também a neoformação óssea. A presença de células inflamatórias mononucleares, principalmente linfócitos, foi observada na região medular. Nenhuma reação do tipo corpo estranho foi evidenciada. Completa o quadro histológico a presença de células adiposas (Fig. 7).

Da mesma maneira, no período de 9 meses, ambos os grupos apresentaram características morfológicas semelhantes. Em todos os cortes histológicos havia a presença constante de fragmentos de aloenxerto com vitalidade. Apesar disso, foi possível observar alguns fragmentos de trabéculas de tecido ósseo sem vitalidade. A região medular ao redor do tecido ósseo mostrou a presença de células adiposas, tecido conjuntivo e vasos sangüíneos. A presença de células inflamatórias mononucleares, principalmente linfócitos, foi observada na região medular. No entanto, nenhuma reação do tipo corpo estranho foi evidenciada. Completa ainda o quadro histológico, a presença de várias áreas de aspecto basofílico com indícios de início de mineralização por substituição e áreas de neoformação óssea (Fig. 8).

Para a análise histométrica realizou-se a mensuração das áreas em porcentagem de osso alógeno residual, osso em neoformação, tecido conjuntivo e área total de osso nas regiões superficial, média e profunda das amostras dos períodos de 6 e 9 meses; e os valores numéricos em porcentagem dos parâmetros histométricos são apresentados na tabela 1. Em todas as variáveis, a normalidade das porcentagens médias dos três segmentos nos dois grupos e nos diferentes períodos foi observada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e, igualmente, o teste de Levene mostrou a homogeneidade de variâncias para as amostras.

Os valores médios em porcentagem das áreas do osso alógeno residual, osso em neoformação e tecido conjuntivo variaram no tempo de observação para ambos os grupos. As áreas do osso alógeno residual no grupo 1 variaram de  $19,97 \pm$

12,45% em 6 meses e  $22,90 \pm 16,91\%$  em 9 meses; enquanto que no grupo 2 foram  $18,90 \pm 11,53\%$  e  $18,95 \pm 11,04\%$  respectivamente. Por sua vez, as áreas do osso em neoformação no grupo 1 variaram de  $14,45 \pm 4,76\%$  em 6 meses e  $18,91 \pm 7,88\%$  em 9 meses; e no grupo 2 foram  $22,65 \pm 6,98\%$  em 6 meses e  $21,68 \pm 8,54\%$  em 9 meses. A área total do osso variou de  $34,42 \pm 13,55\%$  em 6 meses e  $41,76 \pm 13,34\%$  em 9 meses para o grupo 1, e  $41,55 \pm 14,92\%$  em 6 meses e  $40,64 \pm 11,96\%$  em 9 meses para o grupo 2. Foram observadas diferentes variações da área total do osso entre os períodos de 6 e 9 meses nos dois grupos; foram aproximadamente 42% no grupo 1 e 1% no grupo 2. Por outro lado, o tecido conjuntivo apresentou as médias de  $65,57 \pm 13,55\%$  em 6 meses e  $58,23 \pm 13,34\%$  em 9 meses para o grupo 1, e no grupo 2 foram  $58,44 \pm 14,92\%$  e  $59,36 \pm 11,96\%$ , respectivamente.

A comparação entre os dois grupos, nos dois períodos, foi realizada com o teste paramétrico *t* de Student para amostras dependentes e independentes, e todos os resultados, para cada variável, não evidenciaram diferenças estatisticamente significantes, considerando  $p > 0,05$  (Fig. 9,10,11 e 12).

## DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a efetividade do enxerto ósseo alógeno fresco e particulado, associado ou não ao plasma rico em plaquetas, em procedimentos de levantamento do seio maxilar bilateral. Os resultados mostraram, para ambos os grupos, uma reparação normal e organizada do osso alveolar. Se o conceito de sucesso cirúrgico de levantamento do seio maxilar e enxerto ósseo a longo prazo pode ser avaliado pela formação de osso vital e vascularizado<sup>18</sup>, é possível que o mesmo possa ser aplicado ao enxerto ósseo alógeno fresco e particulado

independentemente da associação ao plasma rico em plaquetas. Os resultados histológicos do presente estudo demonstraram estruturas ósseas reparadas que se assemelham aos enxertos autógenos. A análise histológica do tecido ósseo em todas as amostras mostrou características de osso maduro e estruturado, com a vascularização e proliferação osteogênica pronunciadas. É importante ressaltar que havia a presença constante de osso vital, principalmente nas amostras de 9 meses em ambos os grupos. A literatura mostra que a formação de porcentagem elevada do osso vital após um período de reparação pode indicar que um material é apropriado para enxertia e uma grande variedade de resultados com a utilização de enxerto ósseo bovino inorgânico como material de enxerto sinusal mostra que o conteúdo do osso vital pode variar de 2 a 33%.<sup>11,16,48,49</sup>

Em uma meta-análise sobre a reparação óssea nas cirurgias de levantamento de seios maxilares utilizando diversos materiais de enxerto foi demonstrado que a porcentagem de área total do osso pode variar conforme o material aplicado e o tempo de espera para a reparação óssea. No período entre 4 e 9 meses foram demonstradas as médias de 22% com Bio Oss, 27% com a associação de Bio Oss e osso autógeno, 40% com osso autógeno, e 24% com  $\beta$  tricalcio-fosfato; enquanto que, após 9 meses os valores foram 37%, 45%, 35% e 30%, respectivamente.<sup>17</sup> Valores semelhantes foram observados no presente estudo, no qual as médias da área total de osso em 6 e 9 meses variaram de 34,42% e 41,76% para o grupo sem plasma rico em plaquetas; e 41,55 % e 40,64 % para o grupo com plasma rico em plaquetas. Essas taxas de área total do osso reparado nos dois períodos podem servir como indicadores para sustentar uma conduta clínica, ou seja, a partir de 6 meses haveria indicação para os procedimentos de implantes osseointegrados.

Diferentemente da observação histológica do presente resultado, é aceito que a reparação dos enxertos alógenos nos sítios receptores, em especial em forma de blocos córtico-medulares, apresenta uma remodelação lenta devido à presença de corticais espessas que podem dificultar a proliferação dos vasos sanguíneos para o interior do enxerto. Portanto, nessa situação, a substituição incompleta do osso enxertado poderá ocorrer e permanecerá uma grande parcela de osso não vital, ou seja, haverá lacunas livres de osteócitos.<sup>19,20</sup> Todas as amostras nos dois períodos mostraram a reparação em forma de osso trabeculado, a presença de osso imaturo entre as partículas de aloenxertos remanescentes com vitalidade e a intensa vascularização. No entanto, a reparação óssea observada foi incompleta, mesmo no período de 9 meses. Os fragmentos de osso alógeno enxertado não sofreram uma mudança completa por substituição e deposição de novo osso, sugerindo que o processo de incorporação do material de aloenxerto é lento. Isso pode ser explicado pelas características do osso alógeno, o qual é oriundo de osso cortical tibial e apresenta um baixo índice de reabsorção. Especula-se ainda, que o osso alógeno fresco congelado pode ser mais resistente à reabsorção.<sup>50</sup> Apesar da permanência de partículas ósseas não reabsorvidas, essa característica pode ser importante para a manutenção do espaço, por impedir que haja proliferação e ocupação por tecidos moles no período de cicatrização. Vale ressaltar que, apesar disso, a maior parte das estruturas ósseas analisadas apresentou características de densas trabéculas ósseas. Adicionalmente, o ganho ósseo obtido nos períodos de 6 e 9 meses foram significativos; permitindo assim, a reabilitação com implantes osseointegrados. Estes resultados vêm ao encontro com os relatos anteriores.<sup>5,51,52</sup>

Apesar da indicação para uma melhor reparação óssea com a utilização do PRP nos procedimentos de enxertia óssea, os valores médios da porcentagem de

áreas de osso alógeno residual e osso em neoformação, como também da área total dos mesmos foram semelhantes nos dois períodos de observação para ambos os grupos. Na avaliação comparativa utilizando os testes *t* para amostras independentes e pareadas não mostrou diferença significativa entre as variáveis. No entanto, a observação dos valores médios da área total do osso em 6 meses indica que o grupo 2 acelerou a reparação óssea quando comparado ao grupo 1. Porém, a mínima variação ocorrida entre os períodos de 6 e 9 meses demonstra que este evento foi descontinuado. Por outro lado, o grupo 1 apresentou uma variação maior, com a reparação óssea gradual conforme a avaliação entre os períodos. De qualquer maneira, no período de 9 meses, ambos os grupos apresentaram valores semelhantes, não havendo diferenças significativas.

A presença de fragmentos ósseos não vitais nos períodos observados, apesar da reparação óssea densa, indica a necessidade de uma avaliação em um período maior com o enxerto alógeno fresco congelado particulado tibial em seio maxilar.

## CONCLUSÃO

O osso alógeno de tíbia congelado particulado pode ser uma alternativa viável para enxertia óssea no seio maxilar com a finalidade obtenção de volume ósseo para a reabilitação com implantes osseointegrados, independentemente da associação ao plasma rico em plaquetas.

## REFERÊNCIAS

1. Boyne PI, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg* 1980;38:613-6.

2. Misch CE, Judy KW. Classification of partially edentulous arches for implant dentistry. *Int J Oral Implantol* 1987;4:7-13.
3. Boyne PJ. Analysis of performance of root-form endosseous implants placed in the maxillary sinus. *J Long Term Effects Med Implants* 1993;3:143-59.
4. Smiler DG, Johnson PW, Lozada JL, Misch C, Rosenlicht JL, Tatum OH Jr, Wagner JR. Sinus lift graft and endosseous implants: Treatment of the atrophic posterior maxilla. *Dent Clin North Am* 1992;36:151-86.
5. Fugazzotto PA, Vlassis J.; Report of 1633 implants in 814 augmented sinus areas in function for up to 180 months. *Implant Dent* 2007; 16: 369-78.
6. Tarnow DP, Wallace SS, Froum SJ, Rohrer MD, Cho SC. Histologic and clinical comparison of bilateral sinus floor elevations with and without barrier membrane placement in 12 patients: Part 3 of an ongoing prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000; 20: 117-25.
7. Armand S., Kirsch A. Sergent C Kemoum P. Radiographic and histologic evaluation of a sinus augmentation with composite bone graft: a clinical case. *J Periodontol* 2002;73:1082-8.
8. Timmenga N, Raghoobar G, Van Weissenbruch R, Vissink A. Maxillary sinus floor elevation surgery. A clinical, radiographic and endoscopic evaluation. *Clin Oral Implants Res* 2003;14: 322-28.
9. John H-D, Wenz B. Histomorphometric analysis of natural mineral for maxillary sinus augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19:199-7.
10. Lezzy G, Degidi M, Scarano A, Petrone G, Piattelli A. Anorganic bone matrix retrieved 14 years after a sinus augmentation procedure: A histologic and histomorphometric evaluation. *J Periodontol* 2007;78:2057-61.

11. Froum SJ, Wallace SS, Cho SC, Elian N, Tarnow DP. Histomorphometric comparison of a biphasic bone ceramic to anorganic bovine bone for sinus augmentation: 6 to 8 month postsurgical assessment of vital bone formation. A pilot study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008; 28:273-81.
12. Albrektsson T. The healing of autologous bone grafts after varying degrees of surgical trauma. A microscopic and histochemical study in the rabbit. *J Bone Joint Surg Br* 1980;62:403-10.
13. Block M, Kent JN. Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous bone. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55:1281- 6.
14. Acocella A, Sacco R, Niardi P, Agostini T., Early implant placement in bilateral sinus floor augmentation using iliac bone block grafts in severe maxillary atrophy: a clinical, histological, and radiographic case report. *J Oral Implantol* 2009;35:37-44.
15. Del Fabbro M, Testori T, Francetti L, Weinstein R. Systematic review of survival rates for implants placed in the grafted maxillary sinus. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2004; 24: 565-77.
16. Scarano A, Degidi M, Iezzi G, Pecora G, Piattelli M, Orsini G, Caputi S, Perrotti V, Mangano C, Piattelli A. Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant Dentistry* 2006;15:197-207.
17. Handschel J, Simonowska M, Naujoks C, Depprich RA, Ommerborn MA, Meyer U, Kübler NR. A histomorphometric meta-analysis of sinus elevation with various grafting materials. *Head Face Medicine* 2009;5:12.

18. Gapski R, Neiva R, Oh TJ, Wang HL. Histologic analyses of human mineralized bone grafting material in sinus elevation procedures: A case series. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2006; 26:59-69.
19. Keith JD Jr, Petrungaro P, Leonetti JA, Elwell CW, Zeren KJ, Caputo C, Nikitakis NG, Schöpf C, Warner MM. Clinical and histologic evaluation of a mineralized block allograft: results from the development period (2001-2004). *Int J Periodontics Restorative Dent* 2006; 26:321-7.
20. Sohn DS, Lee JK, An KM, Sin HI. Histomorphometric evaluation of mineralized cancellous allograft in the maxillary sinus augmentation: a 4 case report. *Implant Dentistry* 2009; 18:172-1.
21. Guerrero JS, Al-Jandan BA. Allograft for maxillary sinus floor augmentation: a retrospective study of 90 cases. *Implant Dent* 2012;21:136-40.
22. Chiapasco M, Giammattei M, Carmagnola D, Autelitano L, Rabbiosi D, Dellavia C. Iliac crest fresh-frozen allografts and autografts in maxillary and mandibular reconstruction: a histologic and histomorphometric evaluation. *Minerva Stomatol* 2013;62 :3-16.
23. Friedlaender GE. Immune Responses to Osteochondral Allografts. *Current Knowledge and Future Directions. Clin Orthop* 1983;174: 58-68.
24. Friedlaender GE. Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. *J. Bone Joint Surg* 1987; 69:786-90.
25. Carlson ER, Marx RE, Buck BE. The potential for HIV transmission through allogeneic bone. A review of risks and safety. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:17-23.



26. Friedlaender GE, Strong DM, Tomford WW, Mankin HJ .Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. *Orthop Clin North Am* 1999;30:583-8.
27. Dumas A, Gaudin-Audrain C, Mabileau G, Massin P, Hubert L, Basle MF. The influence of processes for the purification of human bone allografts on the matrix surface and cyto compatibility. *Biomaterials* 2006;27:4204-11.
28. Tomford WW, Doppelt SH, Mankin HJ, Friedlaender GE. Bone bank procedures. *Clin Orthop Relat Res* 1983;174:15-21.
29. Leslie HW, Bottenfield S. Donation, banking, and transplantation of allograft tissues. *Nurs Clin North Am* 1989;24:891-905.
30. Lewandrowski KU, Rebmann V, Pässler M, Schollmeier G, Ekkernkamp A, Grosse-Wilde H, Tomford WW. Immune response to perforated and partially demineralized bone allografts. *J Orthop Sci* 2001;6:545-55.
31. Le BT, Borzabadi-Farahani A. Simultaneous implant placement and bone grafting with particulate mineralized allograft in sites with buccal wall defects, a three-year follow-up and review of literature. *J Craniomaxillofac Surg* 2014;42:552-9.
32. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:638-46.
33. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14:529-35.
34. Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent* 2001;13:487-93.

35. Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;22:45-53.
36. Martins MC. Utilização do plasma rico em plaquetas nos procedimentos cirúrgicos de elevação de seio maxilar. Estudo histomorfométrico em humanos. Araraquara 2003: Tese, Universidade Estadual Paulista.
37. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium. A pilot study. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16:250-7.
38. Schilephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31:469-84.
39. Sánchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:93-103.
40. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004;91:4-15.
41. Birang R, Torabi A, Shahabooui M, Rismanchian M. Effect of plasma-rich in platelet-derived growth factors on peri-implant bone healing: An experimental study in canines. *Dent Res J* 2012; 9: 93-9.
42. Poeschl PW, Ziya-Ghazvini F, Schicho K, Ewers R, Schopper C. Application of platelet-rich plasma for enhanced bone regeneration in grafted sinus. *J Oral Maxillofac Surg* 2012; 70:657-64.

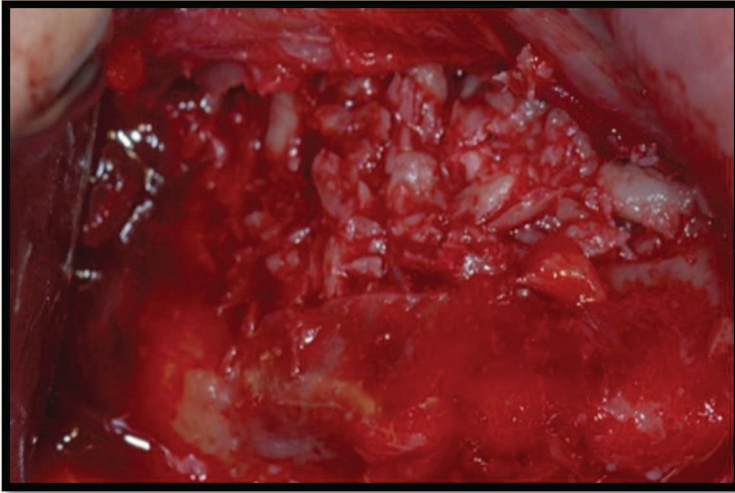
43. Penteado LAM, Colombo CED, Penteado RAPM, Assis AO, Gurgel BCV. Evaluation of bioactive glass and platelet-rich plasma for bone healing in rabbit calvarial defects. *Journal of Oral Science* 2013; 55:225-32.
44. Vercellotti T, De Paoli S, Nevins M. The piezoelectric bony window osteotomy and sinus membrane elevation: introduction of a new technique for simplification of the sinus augmentation procedure. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001; 21:561-7.
45. Hallman M, Seiinerby L, Lundgrcn S. A clinical and histological evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogenous bone or bovine hydroxyapatite, or with a 20:80 mixture. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17:635-43.
46. John H-D, Wenz B. Histomorphometric analysis of natural mineral for maxillary sinus augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19:199-7.
47. Kluger R, Bouhon W. Removal of the surface layers of human cortical bone allografts restores in vitro osteoclast function reduced by processing and frozen storage. *Bone* 2003; 32:291-6.
48. Nevins M, Camelo M, De Angelis N, Hanratty JJ, Khang WG, Kwon JJ, Rasperini G, Rocchietta I, Schpbach P, Kim DM. The clinical and histologic efficacy of xenograf granules for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2011; 31:227-5.
49. Wallace SS, Froum SJ. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; 8:328-48.



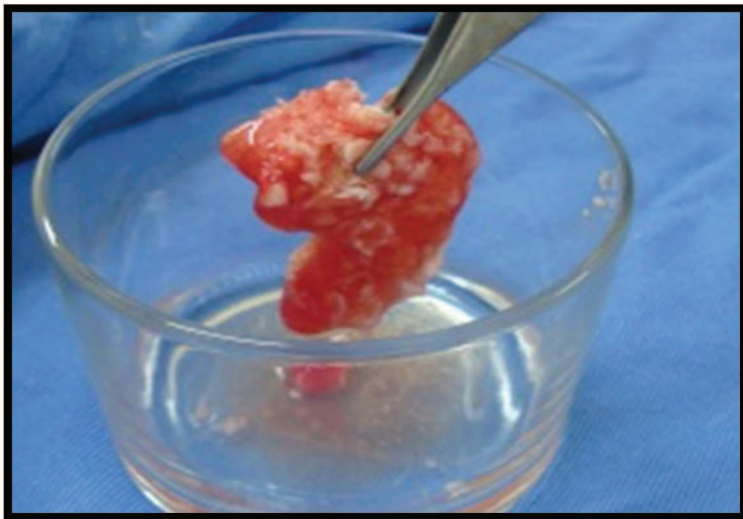
Fig. 1. Bloco de osso alógeno tibial do Banco de Tecidos Músculo-Esquelético do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.



Fig. 2. Osso alógeno fresco particulado e triturado.



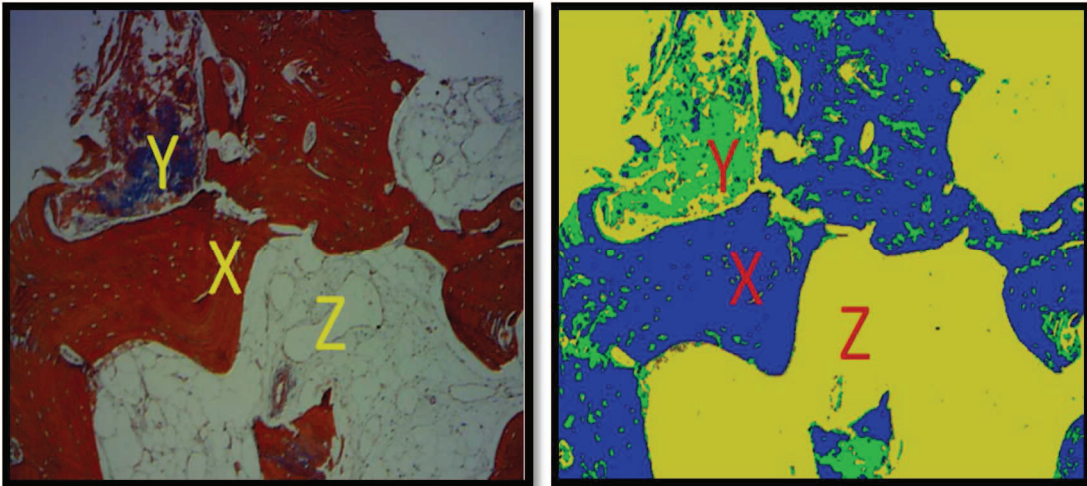
*Fig. 3.* Visualização das partículas do osso alógeno preenchendo a cavidade sinusal.



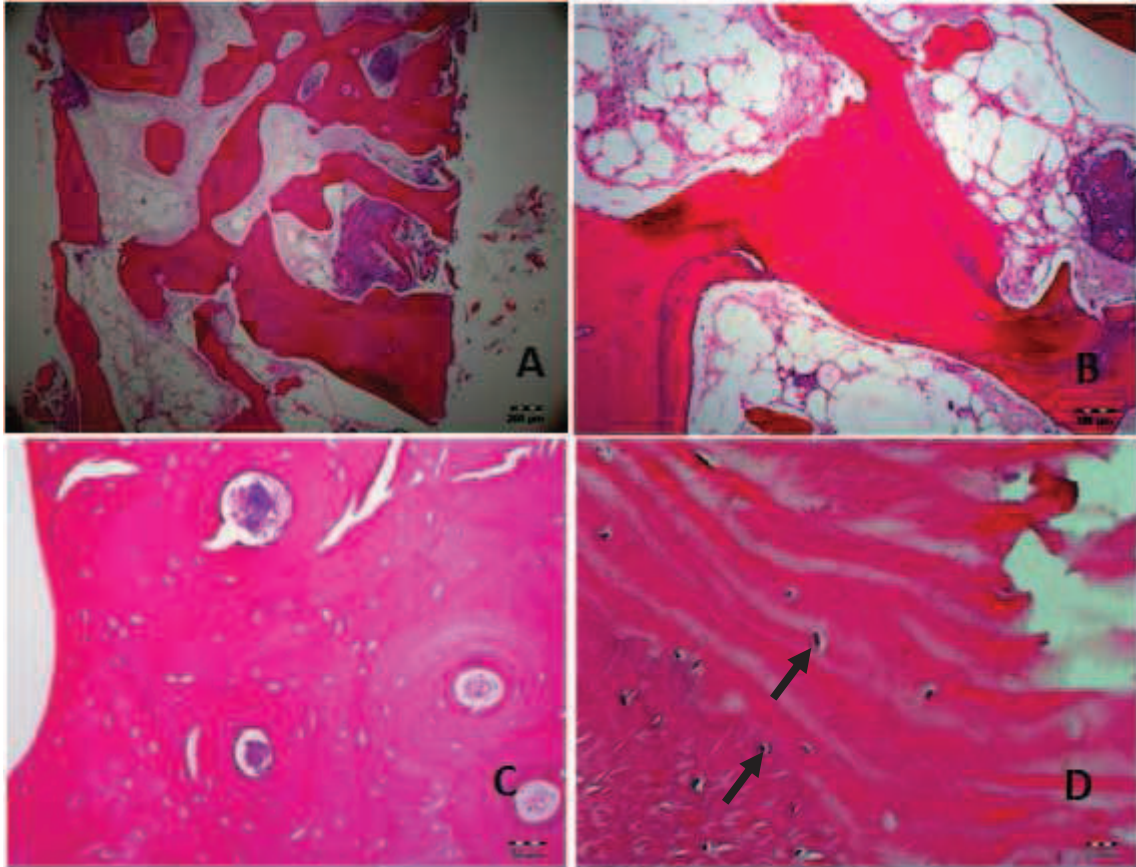
*Fig. 4.* Partículas ósseas trituradas aglutinadas ao gel de plasma rico em Plaquetas.



*Fig. 5.* Visualização da biópsia óssea sendo executada pela broca trefina e o núcleo ósseo retirado para avaliação histológica.

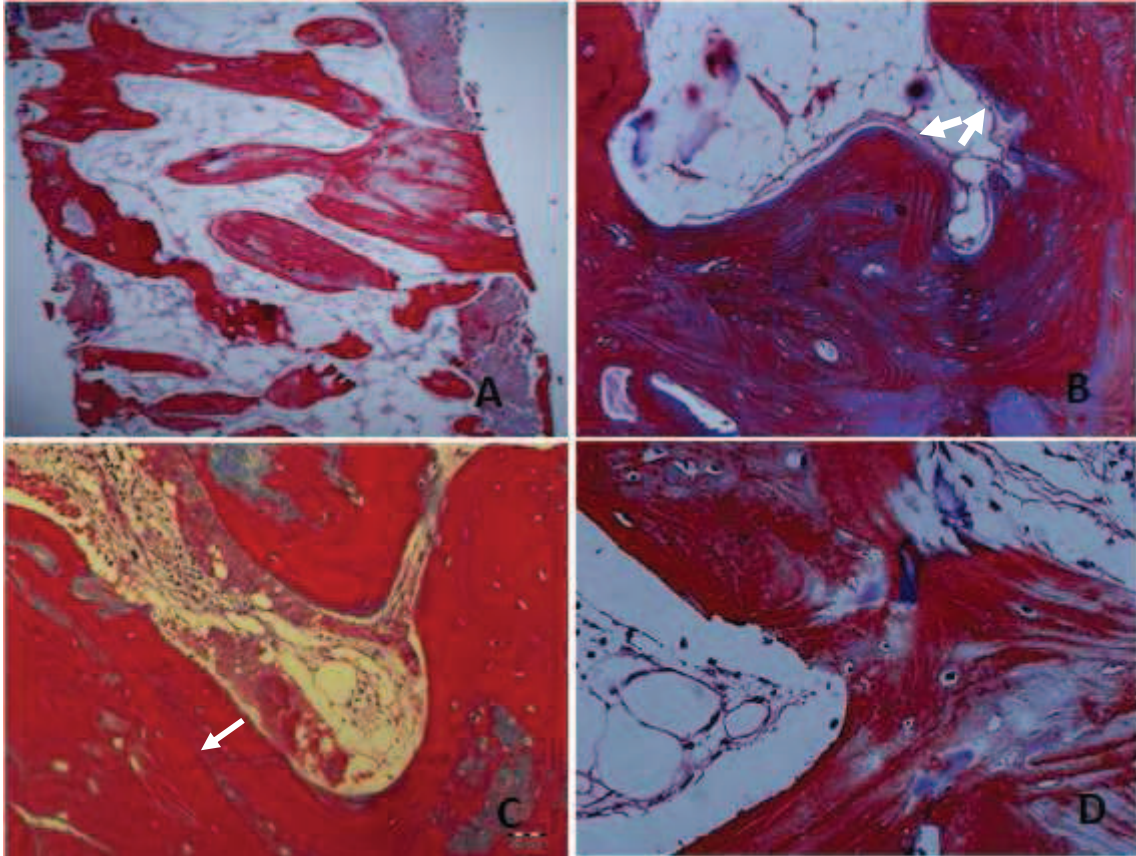


*Fig. 6.* Visualização da máscara padrão para a mensuração das áreas de osso alógeno residual (X), osso em neoformação (Y) e tecido conjuntivo (Z) pelo programa Image-PRO PLUS.



*Fig. 7.* Visualização do corte histológico longitudinal da amostra de 6 meses no grupo 1. Observa-se um trabeculado ósseo organizado e com aspecto de normalidade entremeado por tecido conjuntivo (A) HE 40x. Presença de tecido adiposo ao redor de partículas ósseas alógenas remanescentes e áreas de renovação óssea (B) HE 100x. Fragmento de osso alógeno com a presença parcial de osteócitos e em outras áreas com lacunas, e presença de vasos sanguíneos (C) HE 200x. Osso vital com presença de osteócitos e neoformação óssea sobre as lamelas de tecido ósseo alógeno (seta) (D) HE 400x.

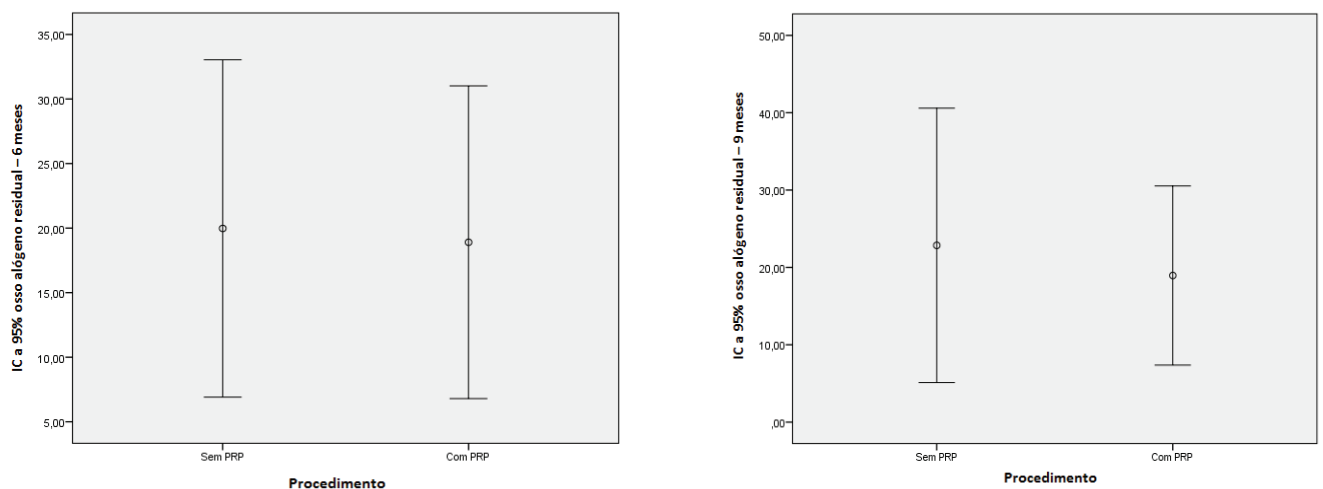




*Fig. 8.* Imagem de corte histológico aos 9 meses do grupo 2. Presença de osso trabecular bem definido e entremeado por tecido conjuntivo (A) Tricrômio de Masson 40x. Renovação óssea intensa em forma de lamelas (em azul), presença de matriz osteóide na superfície (seta) e tecido adiposo ao redor (B) Tricrômio de Masson 100x. Observa-se um remanescente de aloenxerto em reparação com presença e ausência de osteócitos nas lacunas, há ainda uma linha de reversão que separa o osso alógeno residual da nova formação óssea (seta) (C) Tricrômio de Masson 200x. Renovação intensa da partícula óssea alógena com aspecto de vitalidade (D) Tricrômio de Masson 400x.

*Tabela 1.* Histometria da reparação do enxerto ósseo alógeno no seio maxilar associado ou não ao plasma rico em plaquetas nos períodos de 6 e 9 meses.

Variável	Grupo	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Limite inferior	Limite superior	Mínimo	Máximo
Osso alógeno residual 6 meses	s/PRP	6	19,97	12,45	5,08	6,90	33,04	1,41	33,38
	c/PRP	6	18,90	11,53	4,71	6,79	31,01	6,76	37,52
Osso alógeno residual 9 meses	s/PRP	6	22,85	16,91	6,90	5,10	40,59	5,33	47,90
	c/PRP	6	18,95	11,04	4,50	7,36	30,54	2,95	34,32
Osso em neoformação 6 meses	s/PRP	6	14,45	4,76	1,94	9,45	19,45	8,72	19,76
	c/PRP	6	22,65	6,98	2,85	15,32	29,98	16,91	36,08
Osso em neoformação 9 meses	s/PRP	6	18,91	7,88	3,21	10,64	27,18	8,66	31,49
	c/PRP	6	21,68	8,54	3,48	12,71	30,65	10,19	33,54
Tecido conjuntivo 6 meses	s/PRP	6	65,57	13,55	5,53	51,34	79,80	55,43	89,87
	c/PRP	6	58,44	14,92	6,09	42,77	74,10	36,35	72,60
Tecido conjuntivo 9 meses	s/PRP	6	58,23	13,34	5,44	44,23	72,24	43,44	78,80
	c/PRP	6	59,36	11,96	4,88	46,79	71,92	46,95	79,18
Osso total 6 meses	s/PRP	6	34,42	13,55	5,53	20,19	48,65	10,13	44,57
	c/PRP	6	41,55	14,92	6,09	25,89	57,22	27,40	63,65
Osso total 9 meses	s/PRP	6	41,76	13,34	5,49	27,75	55,76	21,20	56,56
	c/PRP	6	40,64	11,96	4,88	28,07	53,20	20,82	53,05



*Fig. 9.* Comparação das áreas do osso alógeno residual entre os grupos em 6 e 9 meses.

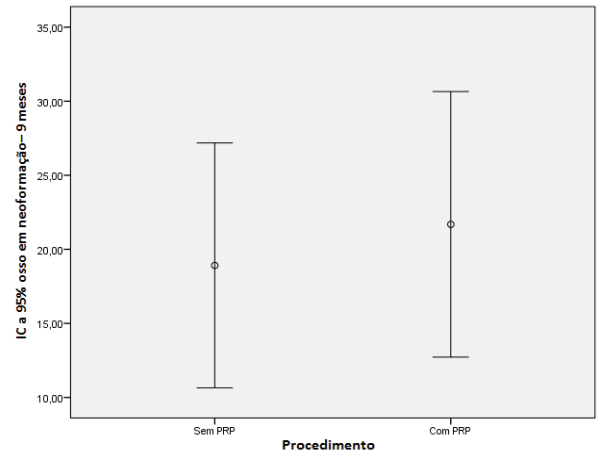
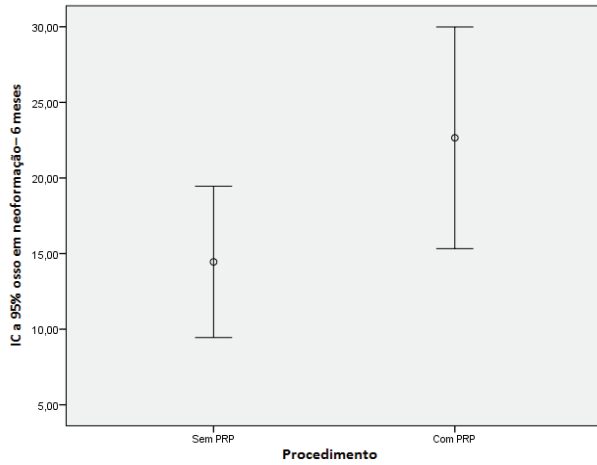


Fig. 10. Comparação das áreas do osso em neoformação entre os grupos em 6 e 9 meses.

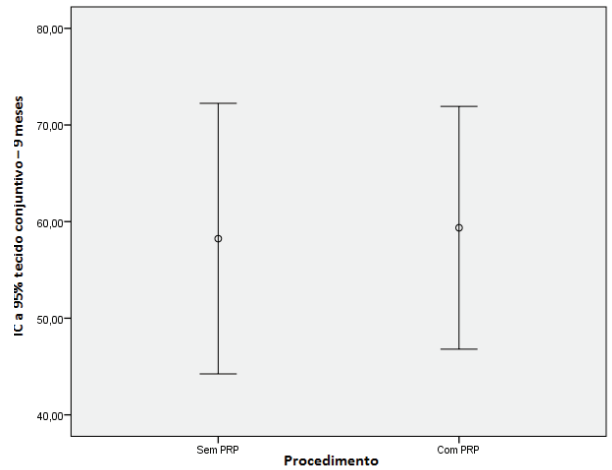
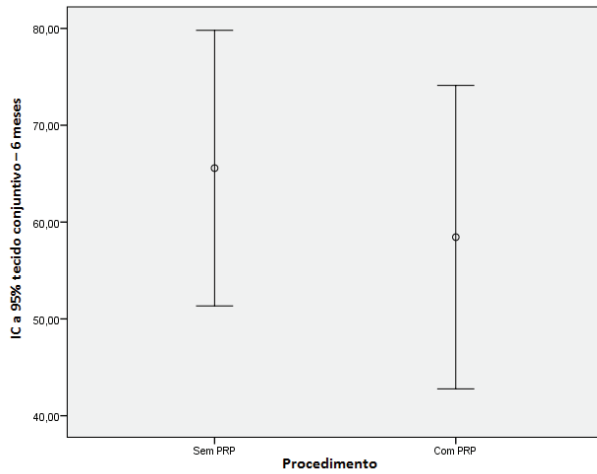


Fig. 11. Comparação das áreas do tecido conjuntivo entre os grupos em 6 e 9 meses.

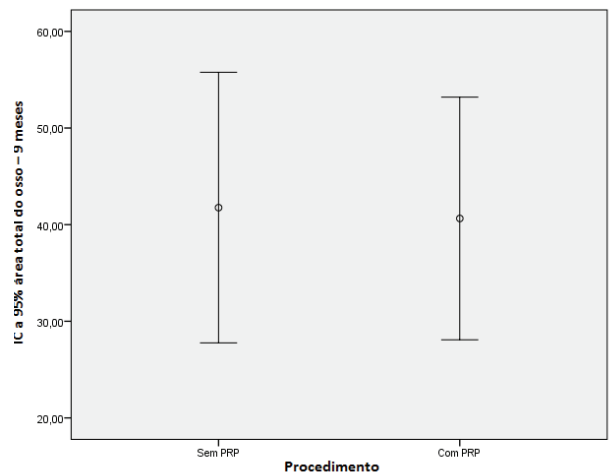
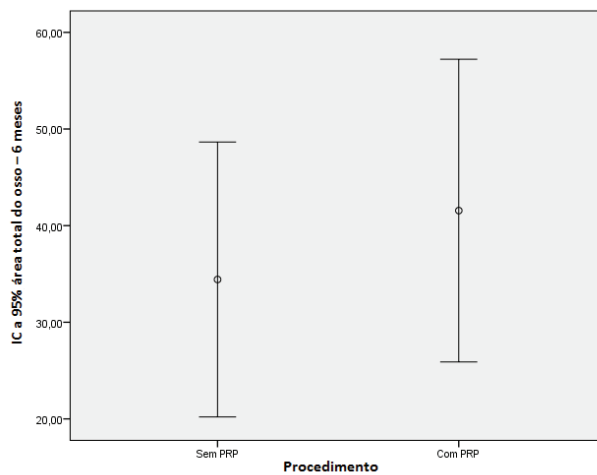


Fig. 12. Comparação das áreas totais do osso entre os grupos em 6 e 9 meses.

**ARTIGO EM INGLÊS**

Fresh frozen particulate allograft bone associated or not to platelet-rich plasma for maxillary sinus floor augmentation.

Antônio Elias Mansur, DDS; MSc;

Sung Hyun Kim, DDS; MSc; PhD

Graduate Program in Periodontics, Pontifical Catholic University of Parana,  
School of Health and Biosciences, Curitiba, Brazil.

Correspondence to:

Prof. Dr. Sung Hyun Kim, Dentistry Course, PUCPR

Rua Imaculada Conceição, 1155 80215-901 Curitiba – Paraná Brazil

e-mail: [sung.kim@pucpr.br](mailto:sung.kim@pucpr.br)

**ABSTRACT**

The study aimed to evaluate histologically tibial fresh frozen particulate allograft bone associated or not to platelets-rich plasma (PRP) in maxillary sinus floor augmentation. Six female adult patients with a bilateral maxillary posterior edentulism required bimaxillary sinus floor augmentation procedures with particulate fresh frozen tibial allograft before dental implant treatment. One side received allograft alone (group 1), and the other received allograft associated to PRP (group 2). The trephine-bur-harvested cylindrical core biopsies were removed for placement of titanium implants from the sinus after 6 and 9 months and they were processed and examined by light microscopy. Histological evaluation revealed organized repair of the alveolar bone in both groups with lamellar bone growth in all the specimens. Histomorphometric analysis revealed that the total bone area varied  $34,32 \pm 13,55$  % in 6 months and  $41,76 \pm 13,34$  % in 9 months in group 1; and  $41,55 \pm 14,92$ % in 6 months and  $40,64 \pm 11,96$ % in 9 months in group 2. There was no statistically significant difference between groups. The trabecular bone repair occurred with tibial fresh frozen particulate allograft bone regardless of the PRP association in the sinus cavity.

**Key-words:** Allograft. Homograft. Maxillary sinus lift. Platelet-rich plasma.

## INTRODUCTION

Severely atrophied posterior maxilla following premature tooth loss and the pneumatization of the maxillary sinus are common limitations for implant treatment.<sup>1-5</sup> Thus, the maxillary sinus floor augmentation procedure with bone grafts has been performed before or in conjunction with implant placement, and its effectiveness has been reported in several studies.<sup>6-11</sup> Although several materials are available for sinus grafting, intra and extra-oral autogenous bone have been the first choice because of its biological and osteogenic properties, which is considered gold standard.<sup>12-14</sup> However, the harvesting procedure at the donor site can represent additional injury, higher morbidity and risks for the patient. Thus, several bone graft substitutes have been applied to the maxillary sinus.<sup>15-27</sup> Among them, the allograft has been an option in procedures that aim to expand the bone volume in the maxilla and jaw for future insertion of the implants.<sup>18-22</sup> Although it does not have osteogenic properties, the allogeneic bone presents osteoconducting activity as well as the osteoinductive property, due to the immunocompatible response promoted between the graft and host.<sup>23-31</sup> The allografts undergo biological changes that are qualitatively similar to the autogenous graft. Despite this, the bone repair mechanism in the recipient site seems to be slower, probably less complete and with an uneven union of the graft material to the recipient tissue, mainly when the graft is the solid block form.<sup>23</sup> Even though, the loss of biological potential might be well accepted as it avoids morbidity and due to its availability regarding quantity.

Additionally, it has been reported that the activation and release of growth factors around the bone graft might promote osteoblastic differentiation and induce bone regeneration.<sup>32-34</sup> Among the various sources, the platelet-rich plasma (PRP) is considered an important source of growth factors. The basic hypothesis of platelet

rich plasma, as a binding agent of bone grafts with high platelet concentrations on a bone wound, might increase the local concentration of growth factors to accelerate the wound healing. Some studies have shown that a combination of PRP with autograft and xenograft did not improve vital bone formation.<sup>35-37</sup> However, several studies reported that the PRP alone or associated to bone grafts might improve significantly the bone repair.<sup>38-43</sup>

Despite the different results in previous studies on bone graft repair, it seems to be important to analyze the combination of allografts and PRP. Thus, the objective of this study was to evaluate histologically tibial fresh frozen particulate allograft bone associated or not to PRP for maxillary sinus floor augmentation.

## MATERIAL AND METHOD

Six healthy adult female patients (mean age 54 years old) with bilateral loss of upper premolars and molars with the presence of less than 4 mm of crestal bone between the sinus floor and the alveolar ridge measured by panoramic radiographs were enrolled in the study.

Patients with sinusitis, systemic diseases, smokers, pregnant, surgical contraindications and continuous medication users were excluded from the experiment. All participants were informed about the advantages, disadvantages and risks associated with this procedure, and they received written informed consent for histological evaluation before each bone sample harvesting procedure. This study was approved by the Ethics Committee of the Ponta Grossa State University, protocol nº 18068/10.

The patients were submitted simultaneously to the bimaxillary sinus floor augmentation procedures. The sinus areas were prepared under local anesthesia

with mepivacaine HCl 2% and epinephrine 1:100.000 (Mapiadre, DFL, Brazil). For each surgical area, crestal incision from the tuberosity to the canine region with a vertical releasing incision was performed and a full-thickness flap reflected laterally to expose the lateral wall of the sinus, using a Molt periosteal elevator (Hu-Friedy, Chicago, IL) to expose the crestal bone and the lateral wall of the maxillary sinus. Using a Piezosurgery device <sup>44</sup> (Driller, São Paulo, Brazil) under sterile saline solution irrigation a trapezoid windows in the lateral sinus wall were performed and the bony windows were removed. The Schneiderian membrane was carefully elevated using curettes for sinus lifting (Neodent, Curitiba, Brazil) from the floor and the walls of the through the osteotomy site and keeping its integrity. The spaces inside the sinus cavities were filled with the allogeneic bone particulate. For each patient, a 20 x 30mm tibial fresh frozen allogeneic bone block was acquired from the Muscle-Skeleton Tissue Bank of the Paraná Federal University Clinic Hospital (Fig. 1). The bone block was first crushed to obtain bone chips with a bone crusher (MOPI Kopp, Curitiba, Brazil) and then grinding with a bone-mill with ratchet (MOM Kopp, Curitiba, Brazil) to achieve fine particles (Fig. 2).

Randomly, on one side as Group 1, the bone particles were carefully packed in the sinus cavity up to the complete filling (Fig. 3). On the opposite side as Group 2, the sinus cavity was filled with bone particles mixed with PRP prior to packing. The bony windows were not repositioned and no membranes were used to cover the grafted areas. The mucoperiosteal flaps were sutured with 4-0 mononylon (techsuture, Bauru, Brazil).

For PRP preparation, one hour before the surgery 20 ml venous blood was drawn. The blood was combined with sodium citrate at 10% to prevent coagulation and it was centrifuged at 1800 rpm for 8 min (Prevasc, DCS-16 – RV, Joinville, Brazil)



to separate the red blood cells, platelet-rich plasma and platelet-poor plasma (PPP)<sup>34</sup>. The PPP layer was removed and the remaining PRP layer collected using a micropipette was added to the calcium chloride solution at 10% the preparation to activate the platelets and to form a platelet gel. Then the tibial fresh frozen particulate allograft bone incorporated with PRP were packed into the sinus cavity (Fig. 4).

The presurgical medication was 4mg dexamethasone oral (Decadron, São Paulo, Brazil) 1 hour before de surgery; and postsurgical medications were amoxillin 500 mg three times daily for 7 days (Amoxil, Medley, Brazil), ibuprofen 600 mg two times for 3 days, and a 0.12% chlorhexidine gluconate mouthwash twice daily for 2 weeks. The sutures were removed 10 days postsurgery.

For all patients, implants placement and bone core biopsies at different sites were planned at 6 to 9 months after surgery. In these periods, bone biopsies were harvested from the implant locations using a 3 x 10mm cylindrical trephine bur (Neodent, Curitiba, Brazil) under saline irrigation for histological evaluation (Fig. 5). Bone biopsies were kept in a 10% of buffered formalin for 72 hours, washed under running water for 24 hours, and demineralized with 5% formic acid solution until they were soft enough to yield to the pressure of a needle point and embedded in paraffin. Six 6 µm serial sections were cut in their long axis, stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome stain for histologic and histometric analysis. Three images of each section at the zones corresponding to the superficial, middle and deep were captured with a digital camera (Dino-Eye USB camera, Dino-Lite, USA) coupled to a light microscope with magnification 40x. The images captured were analyzed using an available image analysis software program (Image-Pro Plus 4.0, Media Cybernetics, USA). A standard mask was performed with the color codes for 3 different investigated tissues and then it was applied to all images, previously

adjusted in micrometer (Fig. 6). The histometric measurements of 24 samples of bone were obtained and the percentages of residual allogeneic bone, new bone and connective tissue were calculated for each subject and the average values were obtained.

## RESULTS

No clinical complications during the clinical follow-up period occurred in all patients. The panoramic radiographs showed newly formed trabecular bone in all periods. Six-month samples revealed similar observations in both groups. In most of them there was normal trabecular bone repair with fragments of vital allograft and others non-vital allograft bone. There were adipose cells, connective tissue and blood vessels network around bone trabeculae. Next to the non-vital allograft bone there were basophilic areas and fibrous connective tissue that showed signs of the onset of mineralization and bone deposition areas. Some mononuclear inflammatory cells, mainly lymphocytes, were observed, but no foreign body reaction was evidenced (Fig. 7). Similar morphological characteristics were observed in nine-month samples for both groups. In most, there was a constant presence of vital allograft bone. However, some residual non-vital bone was observed too (Fig. 8).

The measurements of areas of residual allogeneic bone, new bone, connective tissue and total bone were carried out in the periods of 6 and 9 months for the histometric analysis; and the numerical values in percentage are presented in Table 1. The residual allogeneic bone area in group 1 varied  $19.97 \pm 12.45 \%$  in 6 months and  $22.90 \pm 16.91\%$  in 9 months; while in group 2 they were  $18.90 \pm 11.53\%$  and  $18.95 \pm 11.04\%$  respectively. New bone area varied  $14.45 \pm 4.76\%$  in 6 months and  $21.68 \pm 8.54\%$  in 9 months for group 1; and in group 2 they were  $22,65 \pm 6,98 \%$

and  $21,68 \pm 8,54$  % respectively. Total bone area varied  $34.42 \pm 13.55\%$  in 6 months and  $41.76 \pm 13.34\%$  in 9 months for group 1 and,  $41.55 \pm 14.92\%$  in 6 months and  $40.64 \pm 11.96\%$  in 9 months for group 2. Different variations of total bone area were observed between 6 and 9 months for both groups; they were approximately 42% in group 1 and 1% in group 2. On the other hand, the connective tissue presented  $65.57 \pm 13.55\%$  in 6 months and  $58.23 \pm 13.34\%$  in 9 months for group 1, and in group 2 they were  $58.44 \pm 14.925$  and  $59.36 \pm 11.96\%$  respectively.

Kolmogorov-Smirnov test checked the normality of data distribution and Levene's test the homogeneity of variances. The significance level was 0.05 and for the comparison between groups, in both periods, was used a Student's parametric *t* test for dependent and independent samples; and was observed that there was no differences (Fig. 9, 10, 11 and 12).

## DISCUSSION

Among the several bone-graft substitutes used for maxillary sinus floor augmentation procedure, the allograft has been an option. This study evaluated tibial fresh frozen particulate allograft bone associated or not to PRP for bimaxillary sinus floor augmentation. Present results revealed normal and organized trabecular bone restoration in the healing site in both groups. If the success rate of maxillary sinus floor augmentation procedure with bone graft can be evaluated by present of vital and well vascularized bone<sup>18</sup>, it is possible to relate to the fresh and particulate allogeneic bone graft regardless of the association with the platelet rich plasma. Present results revealed allograft bone repair process that was similar to autogenous grafts. All of the samples revealed mature and structured trabecular bone; and there

was noticeable blood vessels proliferation. It is important to highlight that there was constant presence of vital bone, mainly in the 9-month samples in both groups. High percentage of vital bone during repair period might indicate that the material is suitable for grafting. Previous results with inorganic bovine bone graft as the sinuses graft material shows that the vital bone content can vary from 2 to 33%.<sup>11,16,45,46</sup>

A meta-analysis of the bone repair in maxillary sinus floor augmentation using several bone graft demonstrated that the total bone area percentage might vary according to the material employed and the time to repair. Period range of 4 and 9 months, 22% with Bio Oss, 27% with Bio Oss in association with autogenous bone, 40% with autogenous bone and 24%  $\beta$  tri-calcium phosphate were found; while after 9 months the mean values were 37%, 45%, 35% and 30%, respectively.<sup>17</sup> Similar values were observed in this study, the total bone area in 6 and 9 months varied from 34,42% and 41,76% in group 1; and 41,55% and 40,64% in group 2. The rate of total bone area in both periods would be conducted in clinical practice for implant placement from 6 months.

Unlike the histological findings in this study, it is usually accepted that allograft repair, especially in bone block graft, present slow remodeling process due to the presence of thick cortical bone. Therefore, in this situation, a large portion of non-vital bone will remain, with empty lacunae.<sup>19,20</sup> All the samples in both periods demonstrated normal repair with trabecular bone, the presence of immature bone between the remaining allograft particles with vitality and intense blood vessels proliferation. However, the incomplete bone repair was observed even in the 9-month period. The allogeneic bone graft fragments did not undergo complete change through substitution and new bone deposition, suggesting that the allograft material incorporation is slow. This might be explained by the allogeneic bone characteristics,

which comes from the tibia cortical and presents a low resorption index. It is also thought that the fresh frozen allogeneic bone might be more resistant to resorption.<sup>47</sup> Despite the permanence of non-resorbed bone particles, this characteristic might be an important ally to keep the space as it prevents the proliferation and occupation by soft tissues during the healing process. It is important to highlight that most of the bone structures presented dense and functional trabecular bone for implant rehabilitation in the periods of 6 and 9 months. These results are in accordance with previous findings of maxillary sinus floor augmentation procedures.<sup>5,48,49</sup>

Despite the indication of PRP in bone graft procedures, the mean values of residual allogeneic bone, new bone formation, as well as total bone area, there was no significant difference in the periods observed and in both groups. Comparative evaluation using the *t* tests for independent and paired samples showed no significant difference between variables. However, the mean values of total bone area in six months indicated that, group 2 had an accelerated bone repair when compared to group 1. Still, minimum variation occurred from 6 months to 9 months in the group 2 revealed that this event was not continuous. On the other hand, group 1 presented higher variation between periods. In general, gradual bone repair occurred according to the evaluation period. However, in the 9-month period, both groups presented similar values, without any significant differences.

The presence of non-vital bone fragments in all periods, in spite of functional trabecular bone repair; indicate the need of a longer period evaluation with tibial fresh frozen particulate allograft bone in maxillary sinus.

## CONCLUSION

Within the scope of this study, it was concluded that the tibial fresh frozen particulate allograft bone is a viable alternative for bone grafts in maxillary sinus for implant placement, regardless of their association with platelet rich plasma.

## REFERENCES

1. Boyne PI, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg* 1980;38:613-6.
2. Misch CE, Judy KW. Classification of partially edentulous arches for implant dentistry. *Int J Oral Implantol* 1987;4:7-13.
3. Boyne PJ. Analysis of performance of root-form endosseous implants placed in the maxillary sinus. *J Long Term Effects Med Implants* 1993;3:143–59.
4. Smiler DG, Johnson PW, Lozada JL, Misch C, Rosenlicht JL, Tatum OH Jr, Wagner JR. Sinus lift graft and endosseous implants: Treatment of the atrophic posterior maxilla. *Dent Clin North Am* 1992;36:151–86.
5. Fugazzotto PA, Vlassis J.; Report of 1633 implants in 814 augmented sinus areas in function for up to 180 months. *Implant Dent* 2007; 16: 369-78.
6. Tarnow DP, Wallace SS, Froum SJ, Rohrer MD, Cho SC. Histologic and clinical comparison of bilateral sinus floor elevations with and without barrier membrane placement in 12 patients: Part 3 of an ongoing prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000; 20: 117-25.
7. Armand S., Kirsch A. Sergent C Kemoum P. Radiographic and histologic evaluation of a sinus augmentation with composite bone graft: a clinical case. *J Periodontol* 2002;73:1082-8.

8. Timmenga N, Raghoobar G, Van Weissenbruch R, Vissink A. Maxillary sinus floor elevation surgery. A clinical, radiographic and endoscopic evaluation. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:322-28.
9. John H-D, Wenz B. Histomorphometric analysis of natural mineral for maxillary sinus augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19:199-7.
10. Lezzy G, Degidi M, Scarano A, Petrone G, Piattelli A. Anorganic bone matrix retrieved 14 years after a sinus augmentation procedure: A histologic and histomorphometric evaluation. *J Periodontol* 2007;78:2057-61.
11. Froum SJ, Wallace SS, Cho SC, Elian N, Tarnow DP. Histomorphometric comparison of a biphasic bone ceramic to anorganic bovine bone for sinus augmentation: 6 to 8 month postsurgical assessment of vital bone formation. A pilot study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008; 28:273-81.
12. Albrektsson T. The healing of autologous bone grafts after varying degrees of surgical trauma. A microscopic and histochemical study in the rabbit. *J Bone Joint Surg Br* 1980;62:403-10.
13. Block M, Kent JN. Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous bone. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55:1281- 6.
14. Acocella A, Sacco R, Niardi P, Agostini T., Early implant placement in bilateral sinus floor augmentation using iliac bone block grafts in severe maxillary atrophy: a clinical, histological, and radiographic case report. *J Oral Implantol* 2009;35:37-44.
15. Del Fabbro M, Testori T, Francetti L, Weinstein R. Systematic review of survival rates for implants placed in the grafted maxillary sinus. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2004; 24: 565–77.

16. Scarano A, Degidi M, Iezzi G, Pecora G, Piattelli M, Orsini G, Caputi S, Perrotti V, Mangano C, Piattelli A. Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant Dentistry* 2006;15:197-207.
17. Handschel J, Simonowska M, Naujoks C, Depprich RA, Ommerborn MA, Meyer U, Kübler NR. A histomorphometric meta-analysis of sinus elevation with various grafting materials. *Head Face Medicine* 2009;5:12.
18. Gapski R, Neiva R, Oh TJ, Wang HL. Histologic analyses of human mineralized bone grafting material in sinus elevation procedures: A case series. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2006; 26:59-69.
19. Keith JD Jr, Petrungaro P, Leonetti JA, Elwell CW, Zeren KJ, Caputo C, Nikitakis NG, Schöpf C, Warner MM. Clinical and histologic evaluation of a mineralized block allograft: results from the development period (2001-2004). *Int J Periodontics Restorative Dent* 2006; 26:321-7.
20. Sohn DS, Lee JK, An KM, Sin HI. Histomorphometric evaluation of mineralized cancellous allograft in the maxillary sinus augmentation: a 4 case report. *Implant Dentistry* 2009; 18:172-1.
21. Guerrero JS, Al-Jandan BA. Allograft for maxillary sinus floor augmentation: a retrospective study of 90 cases. *Implant Dent* 2012;21:136-40.
22. Chiapasco M, Giammattei M, Carmagnola D, Autelitano L, Rabbiosi D, Dellavia C. Iliac crest fresh-frozen allografts and autografts in maxillary and mandibular reconstruction: a histologic and histomorphometric evaluation. *Minerva Stomatol* 2013;62 :3-16.
23. Friedlaender GE. Immune Responses to Osteochondral Allografts. *Current Knowledge and Future Directions. Clin Orthop* 1983;174: 58-68.



24. Friedlaender GE. Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. *J. Bone Joint Surg* 1987; 69:786-90.
25. Carlson ER, Marx RE, Buck BE. The potential for HIV transmission through allogeneic bone. A review of risks and safety. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:17-23.
26. Friedlaender GE, Strong DM, Tomford WW, Mankin HJ .Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. *Orthop Clin North Am* 1999;30:583-8.
27. Dumas A, Gaudin-Audrain C, Mabileau G, Massin P, Hubert L, Basle MF. The influence of processes for the purification of human bone allografts on the matrix surface and cyto compatibility. *Biomaterials* 2006;27:4204-11.
28. Tomford WW, Doppelt SH, Mankin HJ, Friedlaender GE. Bone bank procedures. *Clin Orthop Relat Res* 1983;174:15-21.
29. Leslie HW, Bottenfield S. Donation, banking, and transplantation of allograft tissues. *Nurs Clin North Am* 1989;24:891-905.
30. Lewandrowski KU, Rebmann V, Pässler M, Schollmeier G, Ekkernkamp A, Grosse-Wilde H, Tomford WW. Immune response to perforated and partially demineralized bone allografts. *J Orthop Sci* 2001;6:545-55.
31. Le BT, Borzabadi-Farahani A. Simultaneous implant placement and bone grafting with particulate mineralized allograft in sites with buccal wall defects, a three-year follow-up and review of literature. *J Craniomaxillofac Surg* 2014;42:552-9.
32. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:638-46.

33. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14:529–35.
34. Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent* 2001;13:487-93.
35. Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;22:45-53
36. Martins MC. Utilização do plasma rico em plaquetas nos procedimentos cirúrgicos de elevação de seio maxilar. Estudo histomorfométrico em humanos. Araraquara 2003: Tese, Universidade estadual paulista.
37. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium. A pilot study. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16:250-7.
38. Schilephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31:469-84.
39. Sánchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:93-103.
40. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004;91:4-15.
41. Birang R, Torabi A, Shahabooui M, Rismanchian M. Effect of plasma-rich in platelet-derived growth factors on peri-implant bone healing: An experimental study in canines. *Dent Res J* 2012; 9: 93-9.

42. Poeschl PW, Ziya-Ghazvini F, Schicho K, Ewers R, Schopper C. Application of platelet-rich plasma for enhanced bone regeneration in grafted sinus. *J Oral Maxillofac Surg* 2012; 70:657-64.
43. Penteado LAM, Colombo CED, Penteado RAPM, Assis AO, Gurgel BCV. Evaluation of bioactive glass and platelet-rich plasma for bone healing in rabbit calvarial defects. *Journal of Oral Science* 2013; 55:225-32.
44. Vercellotti T, De Paoli S, Nevins M. The piezoelectric bony window osteotomy and sinus membrane elevation: introduction of a new technique for simplification of the sinus augmentation procedure. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001; 21:561-7
45. Hallman M, Seiinerby L, Lundgren S. A clinical and histological evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogenous bone or bovine hydroxyapatite, or with a 20:80 mixture. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17:635-43.
46. John H-D, Wenz B. Histomorphometric analysis of natural mineral for maxillary sinus augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19:199-7.
47. Kluger R, Bouhon W. Removal of the surface layers of human cortical bone allografts restores in vitro osteoclast function reduced by processing and frozen storage. *Bone* 2003; 32:291-6
48. Nevins M, Camelo M, De Angelis N, Hanratty JJ, Khang WG, Kwon JJ, Rasperini G, Rocchietta I, Schpach P, Kim DM. The clinical and histologic efficacy of xenograft granules for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2011; 31:227-5.

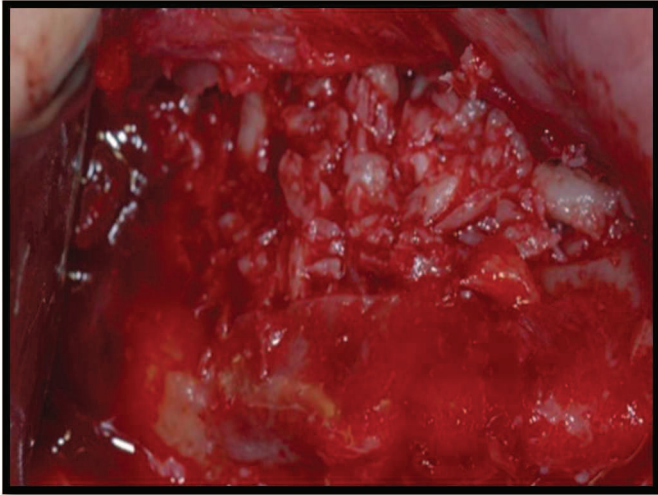
49. Wallace SS, Froum SJ. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; 8:328-48.



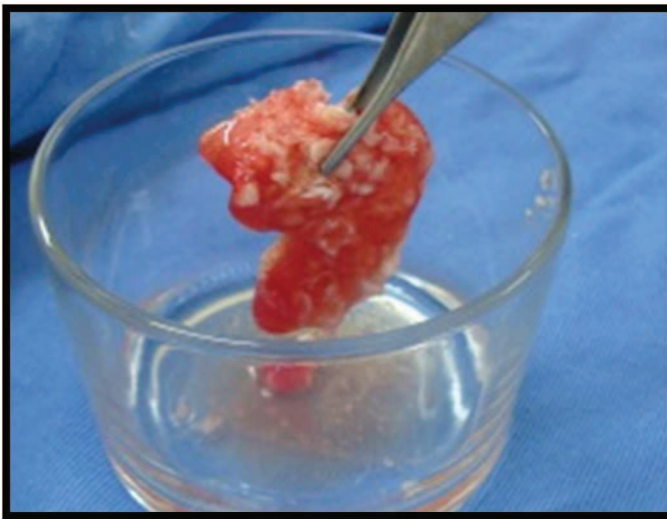
*Fig. 1.* Tibia allogeneic bone block from the Muscle-skeleton tissue Bank of Federal University of Parana.



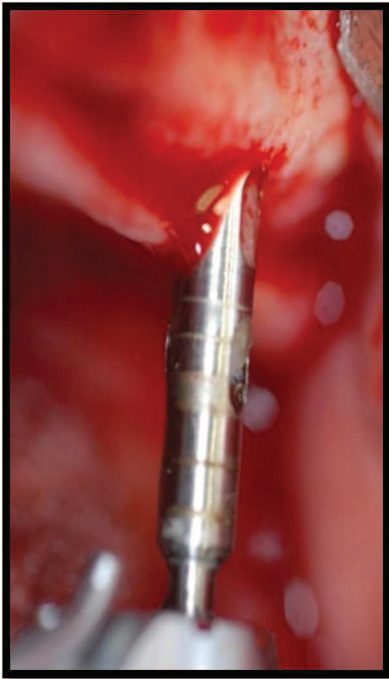
*Fig. 2.* Fresh frozen particulate allograft bone.



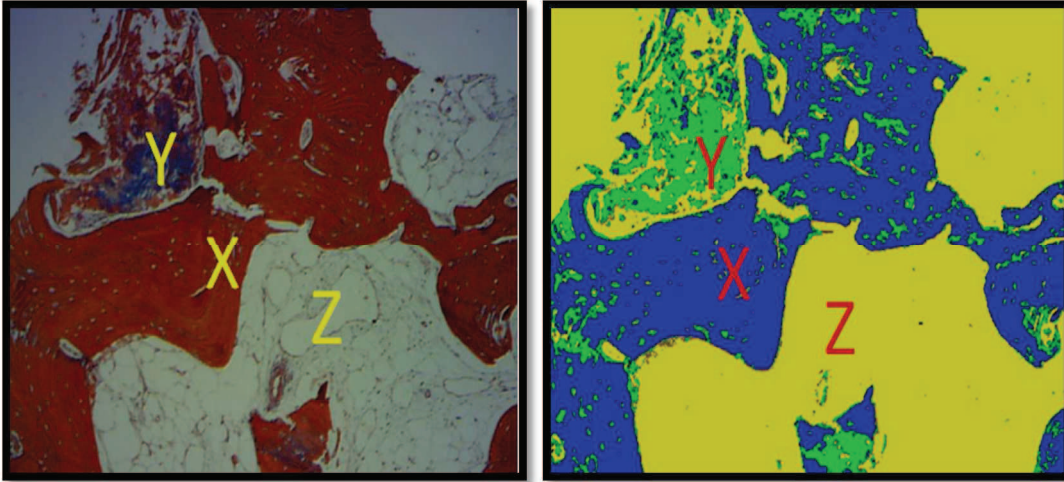
*Fig. 3.* View of allogeneic bone particles filling the sinus cavity.



*Fig. 4.* Particulate allograft bone added to the platelet rich plasma gel.

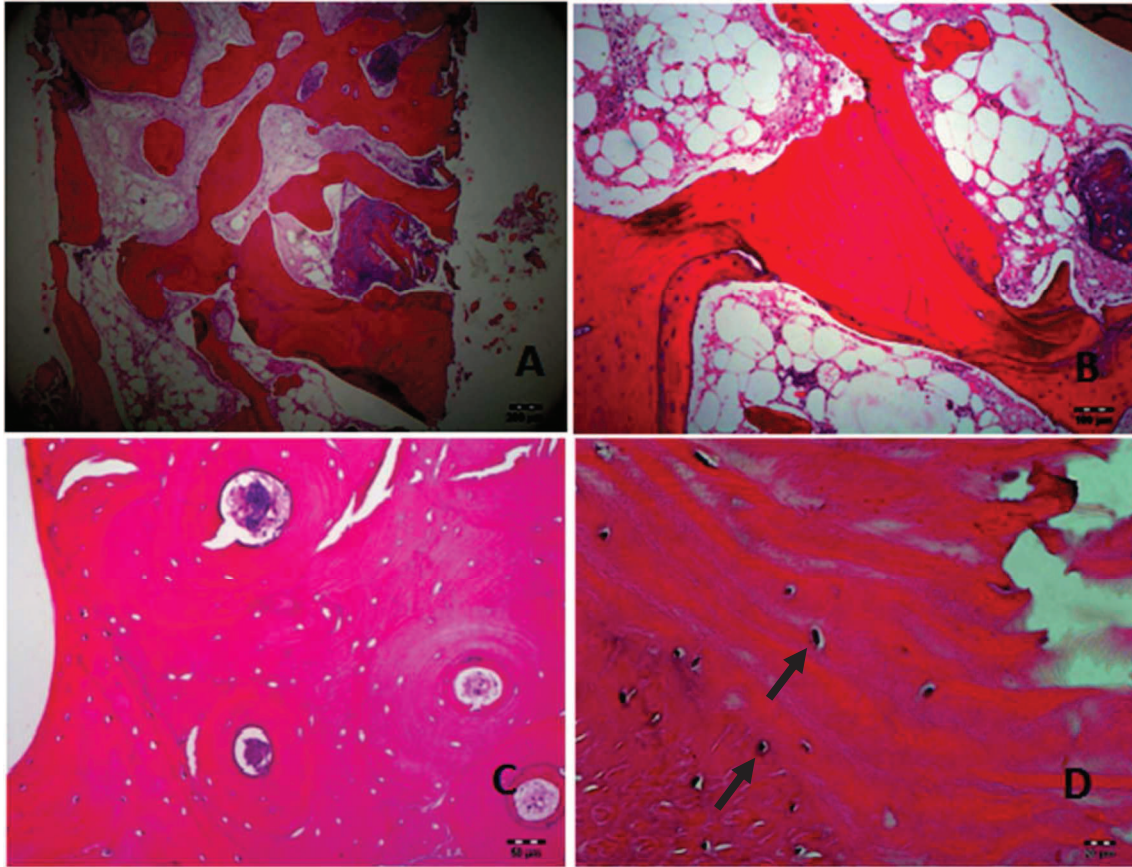


*Fig. 5.* View of the bone biopsy being carried out by the trephine bur and the bone nucleus removed for histological evaluation.

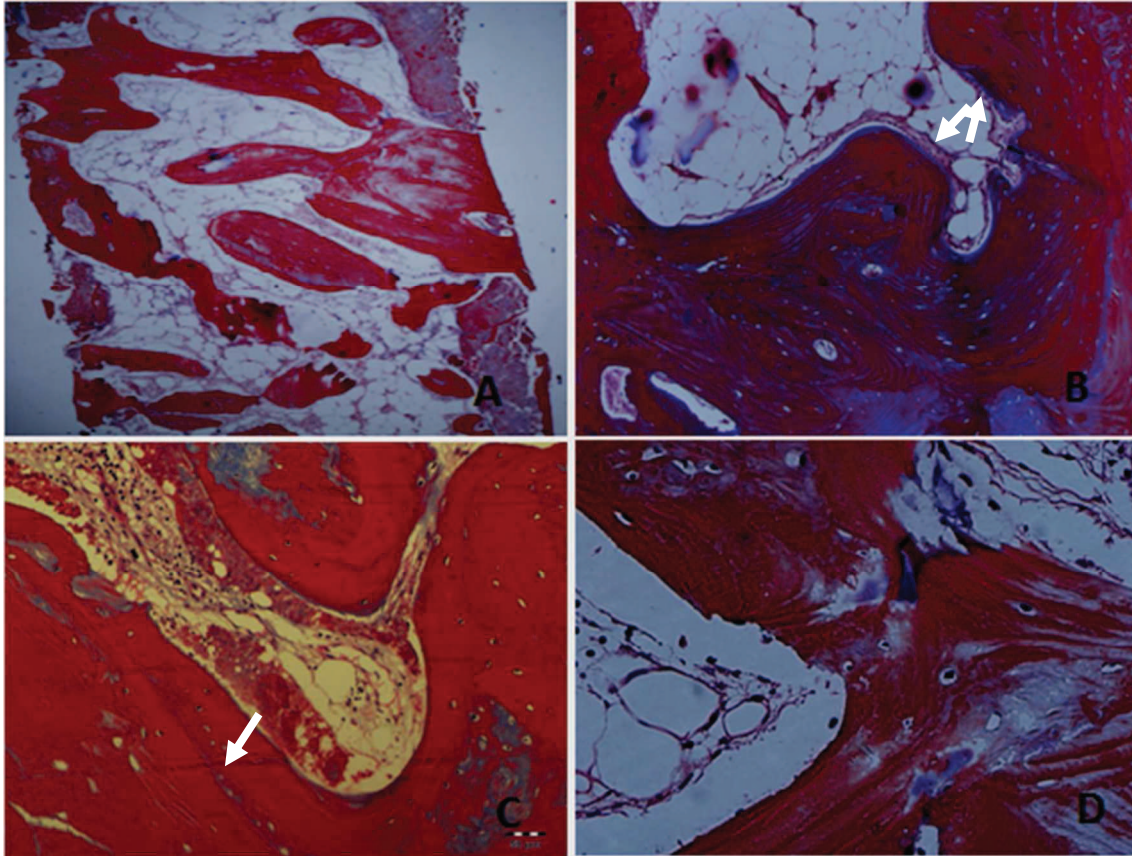


*Fig. 6.* View of the standard mask to measure residual allogeneic bone areas (X), new bone (Y) and connective tissue (Z) through the program Image-PRO PLUS.





*Fig. 7.* View of the longitudinal histological section of a 6-month sample in group 1. An organized trabecular bone is observed with the normal aspect interspersed with conjunctive tissue (A) HE 40x. Adipose tissue is presented around the remaining allogeneic bone particles and new bone areas (B) HE 100x. Allogeneic bone fragment with the presence of osteocytes and other areas with empty lacunae, and presence of blood vessels (C) HE 200x. Vital bone with the presence of osteocytes and new bone formation on the lamellas of the allogeneic bone (arrow) (D) HE 400x.



*Fig. 8.* View of histological section in the 9-month period, group 2. Presence of well defined and trabecular bone and interspersed with conjunctive tissue (A) Masson's trichrome 40x. Intense new bone formation as lamellas (in blue), presence of osteoid matrix on the surface (arrow) and adipose tissue around it (B) Masson's trichrome 100x. Remaining allograft in repair is observed with the presence and absence of osteocytes in the lacunae, there is also a reversion line that separates the residual allogeneic bone from the new bone formation (arrow) (C) Masson's trichrome 200x. Intense renovation of the allogeneic bone particle with vitality aspect (D) Masson's trichrome 400x.

*Table 1.* Histometry of the allogeneic bone graft repair in the maxillary sinus associated or not to the platelets rich plasma in the 6 and 9-month periods.

Variable	Group	N	Mean	Std deviation	Std error	Lower limit	Upper limit	Minimum	Maximum
Residual allogeneic bone 6 months	withoutPRP	6	19,97	12,45	5,08	6,90	33,04	1,41	33,38
	withPRP	6	18,90	11,53	4,71	6,79	31,01	6,76	37,52
Residual allogeneic bone 9 months	withoutPRP	6	22,85	16,91	6,90	5,10	40,59	5,33	47,90
	withPRP	6	18,95	11,04	4,50	7,36	30,54	2,95	34,32
Bone neoformation 6 months	withoutPRP	6	14,45	4,76	1,94	9,45	19,45	8,72	19,76
	withPRP	6	22,65	6,98	2,85	15,32	29,98	16,91	36,08
Bone neoformation 9 months	withoutPRP	6	18,91	7,88	3,21	10,64	27,18	8,66	31,49
	withPRP	6	21,68	8,54	3,48	12,71	30,65	10,19	33,54
Conjunctive tissue 6 months	withoutPRP	6	65,57	13,55	5,53	51,34	79,80	55,43	89,87
	withPRP	6	58,44	14,92	6,09	42,77	74,10	36,35	72,60
Conjunctive tissue 9 months	withoutPRP	6	58,23	13,34	5,44	44,23	72,24	43,44	78,80
	withPRP	6	59,36	11,96	4,88	46,79	71,92	46,95	79,18
Total bone 6 months	withoutPRP	6	34,42	13,55	5,53	20,19	48,65	10,13	44,57
	withPRP	6	41,55	14,92	6,09	25,89	57,22	27,40	63,65
Total bone 9 months	withoutPRP	6	41,76	13,34	5,49	27,75	55,76	21,20	56,56
	withPRP	6	40,64	11,96	4,88	28,07	53,20	20,82	53,05

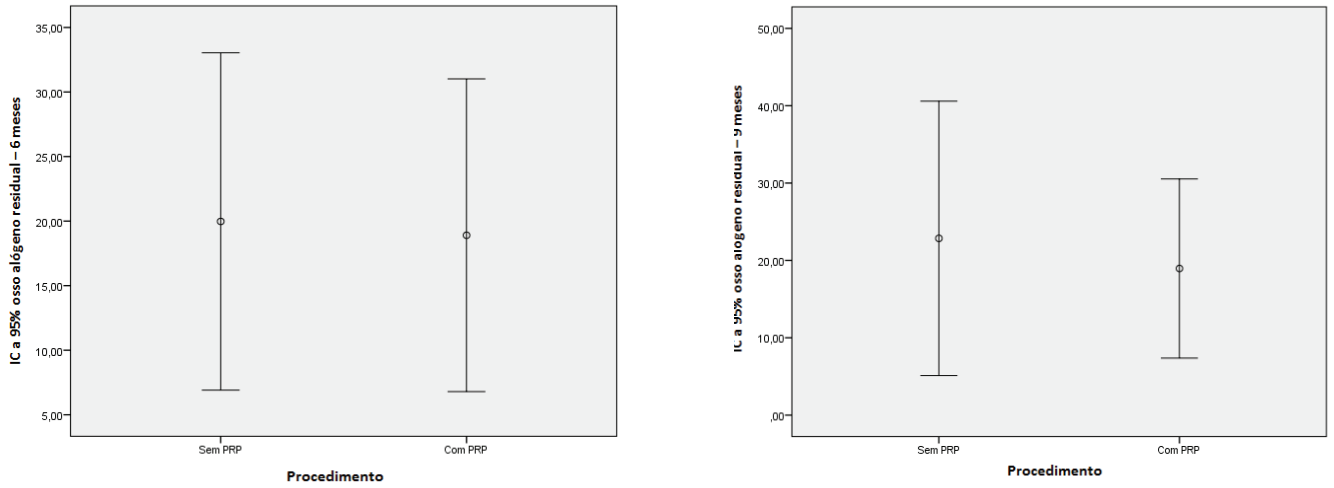


Fig. 9. Comparison of the residual allogeneic bone areas between both groups in 6 and 9 months.

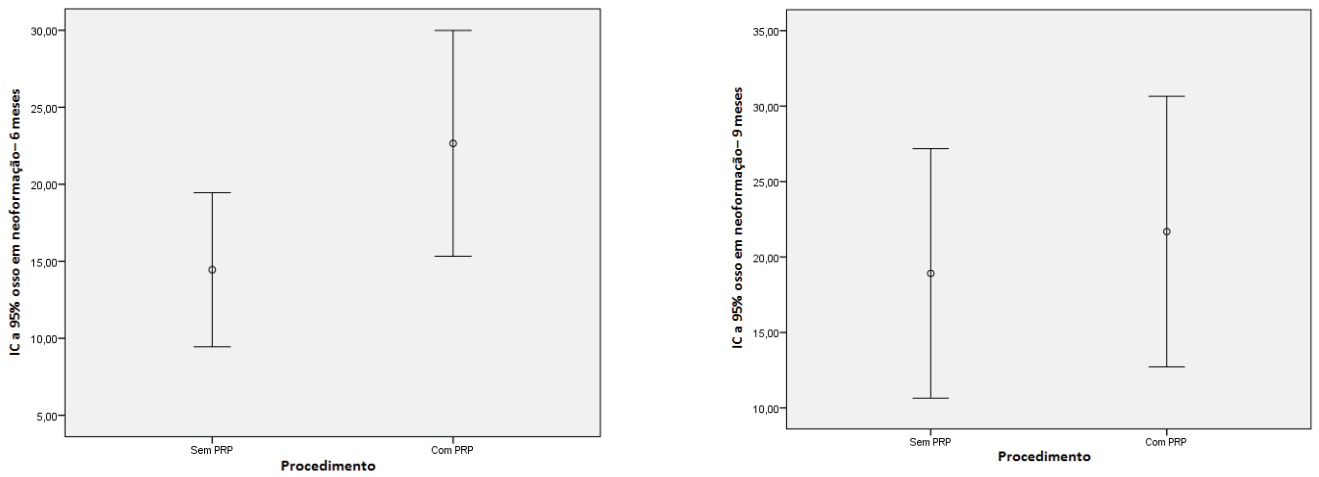


Fig. 10. Comparison of new bone areas between both groups in 6 and 9 months.

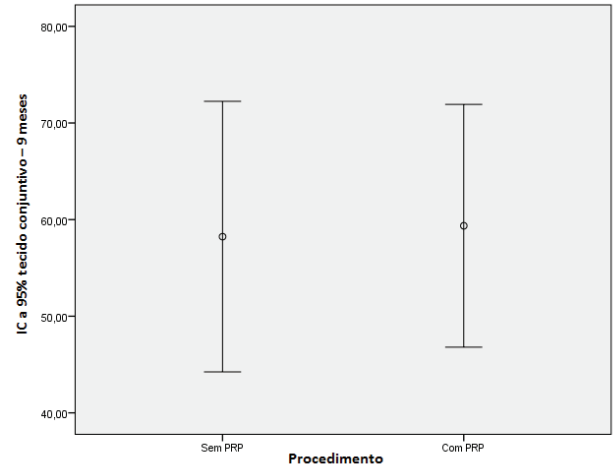
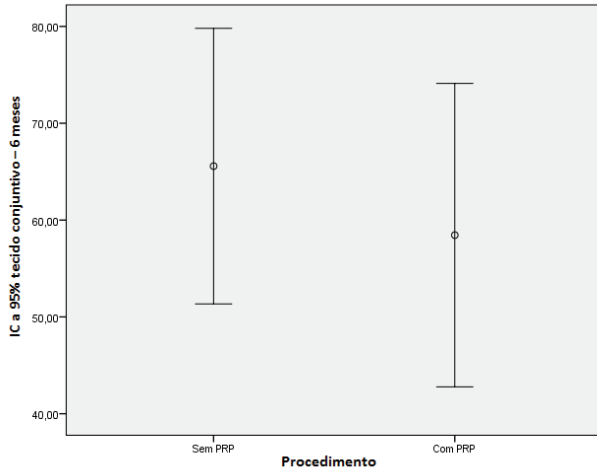


Fig. 11. Comparison of connective tissue areas between both groups in 6 and 9 months.

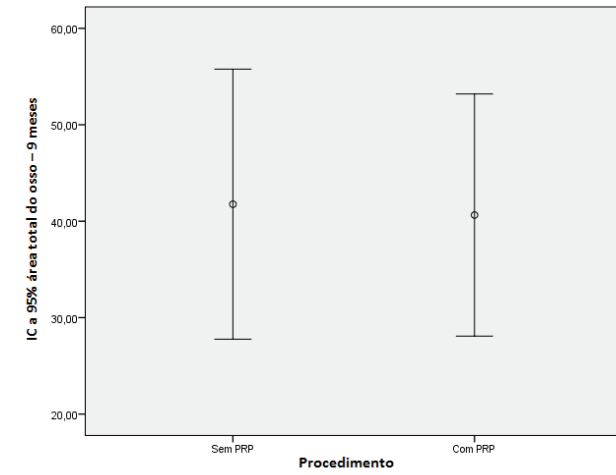
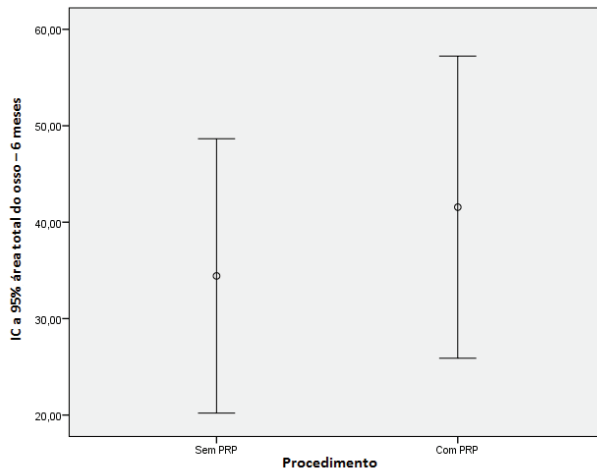


Fig. 12. Comparison of total bone area between both groups in 6 and 9 months.

## ANEXO A – PARECER DE COMITÊ DE ÉTICA



**PARECER Nº 15/2011**

**Protocolo: 18068/10**

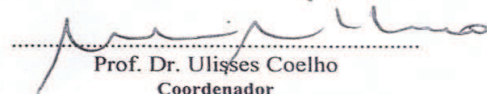
No dia 24 de fevereiro de 2011, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado **"Avaliação histológica do enxerto ósseo alógeno fresco particulado, associado ou não do plasma rico em plaquetas, no seio maxilar"** de responsabilidade do pesquisador Sung Hyun Kim.

Conforme Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a esta Comissão, relatórios sobre andamento da pesquisa, conforme modelo (<http://www.uepg.br/coep/>).

Data para entrega do relatório Final: 24 de fevereiro de 2012.

Ponta Grossa, 25 de fevereiro de 2011.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

  
Prof. Dr. Ulisses Coelho  
Coordenador

## ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, estou sendo convidado a participar de um estudo denominado Enxerto ósseo alógeno fresco congelado particulado associado ou não ao plasma rico em plaquetas no levantamento do seio maxilar. Estudo histológico em humanos, cujos objetivos e justificativas são: aumentar o volume ósseo nas regiões maxilares atróficas com a finalidade de implantes osseointegrados e avaliar a reparação óssea nos seios maxilares submetidos aos procedimentos de enxerto ósseo alógeno particulado associado ou não ao plasma rico em plaquetas.

Inicialmente serei examinado e havendo a necessidade de enxerto ósseo, receberei as informações sobre a indicação, vantagens, desvantagens e benefício seguro do procedimento cirúrgico. Também fui informado que, um pequeno fragmento do enxerto ósseo será examinado por histologia para a quantificação estrutural.

Fui esclarecido de que, do procedimento a se realizar, posso esperar somente benefícios, tais como: aumento do volume ósseo nas regiões posteriores da maxila para receber implantes osseointegrados. Ainda, será coletado 20 ml de sangue venoso uma hora antes da cirurgia para a obtenção do plasma rico em plaqueta.

Recebi também os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do procedimento cirúrgico. Para a prevenção do desconforto pós-operatório, receberei analgésico, anti-inflamatório e antibiótico durante 1 semana. Em relação ao risco cirúrgico, fui informado que poderá ocorrer eventual sangramento ou hemorragia, como também um quadro de sinusite no pós-operatório. Quando isso ocorrer, entrarei em contato imediatamente para uma avaliação e atendimento.

No período pós-operatório de 90 e 180 dias, serei avaliado para averiguação da cicatrização através da tomada radiográfica e serão realizadas biópsias ósseas nas regiões operadas no momento da instalação de implantes osseointegrados.

Fui informado que a coleta de dados clínicos e histológicos serão utilizados como fontes para a produção científica.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são: Antônio Elias Mansur e Sung Hyun Kim, ambos do curso de Pós-graduação em Odontologia da PUCPR, e com eles poderei manter contato pelos telefones 42-99198485 e 41-99742322.

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas conseqüências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma de ressarcimento em dinheiro. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

Ponta Grossa,        de                                de 2013.

Nome:

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dr. Antônio Elias Mansur

Assinatura: \_\_\_\_\_



## ANEXO C – ANÁLISE ESTATÍSTICA

## Tests of Normality

Procedimento		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
		Statistic	f	Valor p
Osso maduro 6 meses	Sem PRP	,205		,200*
	Com PRP	,231		,200*
Osso maduro 9 meses	Sem PRP	,247		,200*
	Com PRP	,187		,200*
Variação Osso maduro 9 meses/Osso maduro 6 meses (%)	Sem PRP	,359		0,0581
	Com PRP	,317		,060
Osso jovem 6 meses	Sem PRP	,187		,200*
	Com PRP	,280		,153
Osso jovem 9 meses	Sem PRP	,157		,200*
	Com PRP	,172		,200*
Variação Osso jovem 9 meses/Osso jovem 6 meses (%)	Sem PRP	,350		0,0208
	Com PRP	,214		,200*
Tecido conjuntivo 6 meses	Sem PRP	,240		0,2000
	Com PRP	,265		,200*
Tecido conjuntivo 9 meses	Sem PRP	,206		,200*
	Com PRP	,169		,200*
Variação Tecido conjuntivo 9 meses/Tecido conjuntivo 6 meses (%)	Sem PRP	,199		,200*
	Com PRP	,193		,200*
Osso total 6 meses	Sem PRP	,267		0,2000
	Com PRP	,265		,200*
Osso total 9 meses	Sem PRP	,206		,200*
	Com PRP	,169		,200*
Variação Osso total 9 meses/Osso total 6 meses (%)	Sem PRP	,386		0,0055
	Com PRP	,172		,200*

## Test of Homogeneity of Variances

	evene Statistic	f1	f2	Valor p
Osso maduro 6 meses	017		0	0,8993
Osso maduro 9 meses	,869		0	0,1212
Varição Osso maduro 9 meses/Osso maduro 6 meses (%)	744		0	0,4086
Osso jovem 6 meses	192		0	0,6706
Osso jovem 9 meses	128		0	0,7281
Varição Osso jovem 9 meses/Osso jovem 6 meses (%)	2,159		0	0,0059
Tecido conjuntivo 6 meses	183		0	0,6778
Tecido conjuntivo 9 meses	095		0	0,7648
Varição Tecido conjuntivo 9 meses/Tecido conjuntivo 6 meses (%)	700		0	0,4224
Osso total 6 meses	183		0	0,6778
Osso total 9 meses	095		0	0,7648
Varição Osso total 9 meses/Osso total 6 meses (%)	,102		0	0,1777

## Descriptives

		Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Osso maduro 6 meses	Sem PRP	19,9750	12,45011	5,08274	6,9094	33,0406	1,41	33,38
	Com PRP	18,9017	11,53860	4,71061	6,7926	31,0107	6,76	37,52
	Total	19,4383	11,45814	3,30768	12,1582	26,7185	1,41	37,52
Osso maduro 9 meses	Sem PRP	22,8500	16,91080	6,90381	5,1032	40,5968	5,33	47,90
	Com PRP	18,9550	11,04037	4,50721	7,3688	30,5412	2,95	34,32
	Total	20,9025	13,76701	3,97419	12,1554	29,6496	2,95	47,90
Variação Osso maduro 9 meses/Osso maduro 6 meses (%)	Sem PRP	88,7900	209,53540	85,54247	-131,1039	308,6839	-63,64	504,26
	Com PRP	25,9817	119,93039	48,96138	-99,8776	151,8409	-72,46	261,09
	Total	57,3858	166,04396	47,93276	-48,1135	162,8851	-72,46	504,26
Osso jovem 6 meses	Sem PRP	14,4517	4,76566	1,94557	9,4504	19,4529	8,72	19,76
	Com PRP	22,6550	6,98509	2,85165	15,3246	29,9854	16,91	36,08
	Total	18,5533	7,13123	2,05861	14,0224	23,0843	8,72	36,08
Osso jovem 9 meses	Sem PRP	18,9133	7,88006	3,21702	10,6437	27,1829	8,66	31,49
	Com PRP	21,6850	8,54543	3,48866	12,7171	30,6529	10,19	33,54
	Total	20,2992	7,96952	2,30060	15,2356	25,3628	8,66	33,54
Variação Osso jovem 9 meses/Osso jovem 6 meses (%)	Sem PRP	44,9650	84,45967	34,48052	-43,6700	133,6000	-25,28	158,26
	Com PRP	-3,4083	30,60208	12,49325	-35,5233	28,7066	-50,63	39,44
	Total	20,7783	65,62258	18,94361	-20,9163	62,4729	-50,63	158,26
Tecido conjuntivo 6 meses	Sem PRP	65,5733	13,55675	5,53452	51,3464	79,8003	55,43	89,87
	Com PRP	58,4433	14,92823	6,09443	42,7771	74,1096	36,35	72,60
	Total	62,0083	14,09610	4,06919	53,0521	70,9646	36,35	89,87
Tecido conjuntivo 9 meses	Sem PRP	58,2367	13,34504	5,44809	44,2319	72,2414	43,44	78,80
	Com PRP	59,3600	11,96964	4,88659	46,7986	71,9214	46,95	79,18
	Total	58,7983	12,10033	3,49306	51,1102	66,4865	43,44	79,18
Variação Tecido conjuntivo 9 meses/Tecido conjuntivo 6 meses (%)	Sem PRP	-10,8433	13,29505	5,42768	-24,7956	3,1090	-23,70	7,39
	Com PRP	4,3367	17,38161	7,09601	-13,9042	22,5775	-18,06	29,16
	Total	-3,2533	16,74865	4,83492	-13,8949	7,3883	-23,70	29,16
Osso total 6 meses	Sem PRP	34,4267	13,55675	5,53452	20,1997	48,6536	10,13	44,57
	Com PRP	41,5567	14,92823	6,09443	25,8904	57,2229	27,40	63,65
	Total	37,9917	14,09610	4,06919	29,0354	46,9479	10,13	63,65
Osso total 9 meses	Sem PRP	41,7633	13,34504	5,44809	27,7586	55,7681	21,20	56,56
	Com PRP	40,6400	11,96964	4,88659	28,0786	53,2014	20,82	53,05
	Total	41,2017	12,10033	3,49306	33,5135	48,8898	20,82	56,56
Variação Osso total 9 meses/Osso total 6 meses (%)	Sem PRP	42,3467	82,58413	33,71483	-44,3201	129,0134	-20,36	206,42
	Com PRP	1,0567	25,49215	10,40713	-25,6957	27,8090	-30,74	35,14
	Total	21,7017	62,13221	17,93603	-17,7753	61,1786	-30,74	206,42

## Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means								
	Sig.		t	f	Valor p	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference			
								Lower	Upper		
Osso maduro 6 meses	Equal variances assumed	,017	,899	,155	0	0,880	1,07333	6,92994	-14,36754	16,51421	
Osso maduro 9 meses	Equal variances assumed	,869	,121	,472	0	0,647	3,89500	8,24485	-14,47566	22,26566	
Variação Osso maduro 9 meses/Osso maduro 6 meses (%)	Equal variances assumed	744	,409	,637	0	0,538	62,80833	98,56333	-156,80446	282,42113	
Osso jovem 6 meses	Equal variances assumed	192	,671	-2,376	0	0,039	-8,20333	3,45213	-15,89515	-,51152	
Osso jovem 9 meses	Equal variances assumed	128	,728	-,584	0	0,572	-2,77167	4,74552	-13,34534	7,80201	
Variação Osso jovem 9 meses/Osso jovem 6 meses (%)	Equal variances not assumed	2,159	,006	1,319	,291	0,233	48,37333	36,67407	-40,36959	137,11626	
Tecido conjuntivo 6 meses	Equal variances assumed	183	,678	,866	0	0,407	7,13000	8,23243	-11,21300	25,47300	
Tecido conjuntivo 9 meses	Equal variances assumed	095	,765	-,153	0	0,881	-1,12333	7,31850	-17,42996	15,18330	
Variação Tecido conjuntivo 9 meses/Tecido conjuntivo 6 meses (%)	Equal variances assumed	700	,422	-1,699	0	0,120	-15,18000	8,93382	-35,08579	4,72579	
Osso total 6 meses	Equal variances assumed	183	,678	-,866	0	0,407	-7,13000	8,23243	-25,47300	11,21300	
Osso total 9 meses	Equal variances assumed	095	,765	,153	0	0,881	1,12333	7,31850	-15,18330	17,42996	
Variação Osso total 9 meses/Osso total 6 meses (%)	Equal variances assumed	,102	,178	1,170	0	0,269	41,29000	35,28453	-37,32883	119,90883	

## Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Osso maduro 6 meses	19,9750	6	12,45011	5,08274
	Osso maduro 9 meses	22,8500	6	16,91080	6,90381
Pair 2	Osso jovem 6 meses	14,4517	6	4,76566	1,94557
	Osso jovem 9 meses	18,9133	6	7,88006	3,21702
Pair 3	Tecido conjuntivo 6 meses	65,5733	6	13,55675	5,53452
	Tecido conjuntivo 9 meses	58,2367	6	13,34504	5,44809
Pair 4	Osso total 6 meses	34,4267	6	13,55675	5,53452
	Osso total 9 meses	41,7633	6	13,34504	5,44809

## Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Valor p
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Osso maduro 6 meses - Osso maduro 9 meses	-2,87500	13,06609	5,33421	-16,58702	10,83702	-,539	5	,613
Pair 2	Osso jovem 6 meses - Osso jovem 9 meses	-4,46167	9,49134	3,87482	-14,42222	5,49888	-1,151	5	,302
Pair 3	Tecido conjuntivo 6 meses - Tecido conjuntivo 9 meses	7,33667	9,72619	3,97070	-2,87034	17,54367	1,848	5	,124
Pair 4	Osso total 6 meses - Osso total 9 meses	-7,33667	9,72619	3,97070	-17,54367	2,87034	-1,848	5	,124

## ANEXO D – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

### International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery

#### Guide for Authors

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](mailto:authorsupport@elsevier.com). Once a paper has been submitted, all subsequent correspondence between the Editorial Office ([ijoms@elsevier.com](mailto: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 this form ([pdf version](#) or [word version](#)) to declare funding, conflict of interest and to indicate whether ethical approval was sought. This information must also be inserted into your manuscript under the acknowledgements section with the headings below. If you have no declaration to make please insert the following statements into your manuscript:

Funding: None

Competing interests: None declared

Ethical approval: Not required

#### 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.

### **Ethics**

Work on human beings that is submitted to the International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki (Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989). The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work. Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

### **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](mailto: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](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 4 figures book reviews
- 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.

### **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.

#### *Format*



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 accuracy of references is the responsibility of the author; please refer to a recent issue of the journal to familiarise yourself with the reference style.** All authors or groups of authors cited in the article must appear in the list of references and vice versa. References in the text should use superscript numerals with or without the name(s) of the author(s): "Kenneth and Cohen<sup>14</sup> showed?", "it has been shown<sup>14</sup> that?" When a cited paper has more than two authors; the citation in the text should appear as "Halsband et al."**The list of references at the end of the**

**paper should be arranged alphabetically and numbered, and must contain the name of all authors.** All references cited in the text must be included in the list of references. Clinical and research articles should have a maximum of 25 references and case reports no more than 10.

Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus (see [www.nlm.nih.gov.uk](http://www.nlm.nih.gov.uk)). 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.

Patient confidentiality: Where illustrations must include recognizable individuals, living or dead, great care must be taken to ensure that consent for publication has been obtained. If identifiable features are not essential to the illustration, please indicate where the illustration can be cropped. In cases where consent has not been obtained and recognizable features may appear, it will be necessary to retouch the illustration to mask the eyes or otherwise render the individual unrecognizable.

### **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.