

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ORAL

Eduardo Pires Godoy

Osteocondutividade de grânulos de enxerto xenógeno bovino de diferentes tamanhos na elevação dos seios maxilares: Um estudo histomorfométrico em coelhos

Ribeirão Preto

2022

EDUARDO PIRES GODOY

Osteocondutividade de grânulos de enxerto xenógeno bovino de diferentes tamanhos na elevação dos seios maxilares: Um estudo histomorfométrico em coelhos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Samuel Porfirio Xavier

RIBEIRÃO PRETO

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Godoy, Eduardo Pires

Osteocondutividade de grânulos de enxerto xenógeno bovino de diferentes tamanhos na elevação dos seios maxilares: Um estudo histomorfométrico em coelhos.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Oral.

Orientador: Xavier, Samuel Porfirio

1. Estudo animal. 2. Elevação do seio maxilar. 3. Reparo ósseo. 4. Osteocondutividade. 5. Enxerto xenógeno.

Nome: GODOY, Eduardo Pires

Título: Osteocondutividade de grânulos de enxerto xenógeno bovino de diferentes tamanhos na elevação dos seios maxilares. Um estudo histomorfométrico em coelhos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração, Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a **Deus**, pela vida e fonte de inspiração.

A minha família, **Fabio Godoy**, **Jocimeire Aparecida Pires Godoy** e **Maria Vitória Pires Godoy** pelos exemplos de amor e perseverança.

A todos que estiveram presentes nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente ao meu orientador, **Prof. Dr. Samuel Porfirio Xavier**, que proporcionou inúmeros ensinamentos e por quem tenho grande admiração e respeito.

Ao meu amigo, **Vitor Ferreira Balan**, pela amizade e suporte em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Danielle Botticelli** da Universidade de Rimini – Itália pelo auxílio em momentos fundamentais para o bom andamento de todo o projeto.

Ao **Prof. Dr. Erick Ricardo Silva**, pelo auxílio e ensinamentos transmitidos.

Aos professores **Adalberto Luiz Rosa, Márcio Mateus Beloti, Paulo Tambasco, Karina Fittipaldi Bombonato Prado, Selma Siessére e Simone Cecílio Hallak Regalo** pelos ensinamentos transmitidos.

À secretária do departamento de Biologia Oral, **Imaculada Jainaira Miguel**, pela presteza e solicitude.

À técnica de laboratório **Adriana Luisa Gonçalves de Almeida**, pela assessoria durante as análises microtomográficas.

Ao técnico de laboratório e **Sebastião Bianco** pela realização do processamento histológico.

Ao médico veterinário do Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, **Raphael Martini Vicente**, pela orientação e supervisão da equipe de bioteristas.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, **Aldo Dias Feiteiro Junior, Antônio Massaro e Edson Campos Ribeiro dos Santos**, pelo cuidado diário dos animais.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP**, onde aprendi a admirar a Odontologia.

Aos **animais** deste trabalho, essenciais para realização da pesquisa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista dos procedimentos clínicos na região experimental. (A) Uma antrostomia de 3,5–4 mm foi preparada em ambos os lados, lateralmente à sutura naso-incisal e anteriormente à sutura nasal-frontal. (B) Grânulos de osso mineral bovino desproteínizado 0,250-1,0 mm ou 1,0-2,0 mm foram alocados aleatoriamente e enxertados dentro do espaço elevado em quantidade semelhante. (C) As antrostomias foram posteriormente cobertas com barreiras de colágeno.41

Figura 2. O microtomógrafo SkyScan® 1172 (Bruker, Kontich, Bélgica) do Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos e Biomateriais (LAB 3D BIO) da FORP- USP foi utilizado para escaneamento das peças. (Fonte:www.bruker.com/pt/products/microtomography).43

Figura 3. Regiões a serem analisadas na elevação de seio maxilar (PC = paredes ósseas; M = médio; SM = submucosa; CtW = perto da janela) e a região da antrostomia (AL = lateral; AM = margem medial; AC = centro da antrostomia).45

Figura 4. Imagens MicroCT 3D que representam o seio elevado utilizando grânulos de 0,125–1 mm e 1–2 mm após 2 (A), 4 (B) e 8 (C) semanas de reparo.49

Figura 5. Secções retificadas representando o seio elevado utilizando grânulos de 0,125-1 mm e 1–2 mm após 2 (A), 4(B), e 8 (C) semanas de reparo. Imagens tiradas originalmente com objetiva x10. Azul de Stevenel e vermelho de alizarina.50

Figura 6. Fotomicrografias representando o reparo após 2 semanas em locais de grânulos pequenos. (A) Novo osso foi encontrado formado próximo às paredes ósseas e na superfície do DBBM. (B) Tecido denso em células semelhantes a fibroblastos foi visto em torno das partículas de DBBM. Um tecido frouxo e vasos, foi interposto entre as partículas. Algumas células multicelulares eram visíveis (por exemplo, *). Ampliação original x200. Azul de Stevenel e vermelho de alizarina.51

Figura 7. Fotomicrografias de seções que representam reparo após 4 semanas em sítios de grânulos grandes. (A) Região das paredes ósseas. Maior quantidade de osso novo foi encontrado em comparação ao período anterior analisado. Algumas células multicelulares ainda eram visíveis (por exemplo, *). (B) O osso novo atingiu com o tempo as regiões mais centrais, formando a partir das paredes ósseas lateral (L) e mesial (M) do seio. O grânulo do centro apresenta maior cromaticidade periférica em relação ao período de reparo anterior. Além disso, parte do tecido denso ao redor do grânulo parecia ter um maior conteúdo de células ativas, especialmente em zonas onde se formou novo osso entre a superfície do enxerto e o aglomerado celular (setas amarelas). Observou-se uma frente de formação de osso novo e tecido osteóide (setas vermelhas). Ampliação original x200. Azul de Stevenel e vermelho de alizarina.52

Figura 8. Fotomicrografias de seções que representam o reparo após 8 semanas em sítios de pequenos grânulos. (A) Espaços medulares foram vistos neste estágio de reparo (asteriscos amarelos). (B) Uma partícula com cromaticidade aumentada, ainda não alcançada por osso recém-formado. Ampliação original x 200. Azul de Stevenel e vermelho de alizarina.53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Componentes do tecido dentro dos seios elevados em três períodos de avaliação. Valores médios (em negrito) \pm desvios padrão; mediana em porcentagens.....51
- Tabela 2.** Tecidos em contato com a superfície do DBBM nos três períodos de avaliação. Valores médios (em negrito) \pm desvios padrão; mediana em porcentagens.....51
- Tabela 3.** BGC nas várias regiões avaliadas dentro do seio elevado nos três períodos de avaliação. Valores médios (em negrito) \pm desvios padrão; mediana em porcentagens.51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Gráficos que representam as porcentagens de contato osso-enxerto e tecido denso em contato com a superfície do enxerto nas várias regiões e períodos avaliados. As estrelas indicam o ponto de intersecção entre o novo osso e o tecido denso.54

LISTA DE SÍMBOLOS

μm - Micrometro

mm - Milímetro

mm³ - Milímetro cúbico

cm - Centímetro

mg - Miligrama

g - Grama

kg - Quilograma

ml - Mililitro

ms - Milissegundo

μA - Microampere

AL – Alumínio

KV - Quilovolt

H - Hora

TM – Trade mark

® - Marca registrada

% - Porcento

°C – Grau Celcius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 PROPOSIÇÃO	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Seleção da amostra	39
3.2 Randomização	39
3.3 Procedimento cirúrgico	40
3.4 Manutenção dos animais	41
3.5 Eutanásia	42
3.6 Avaliação Microtomográfica	42
3.7 Preparação histológica	43
3.8 Calibração para avaliação histomorfométrica	43
3.9 Avaliação histomorfométrica	44
3.10 Análise de dados	45
4 RESULTADOS	49
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÃO	63
7 REFERÊNCIAS	67
ANEXOS	71
ARTIGO PUBLICADO	73

Osteocondutividade de grânulos de enxerto xenógeno bovino de diferentes tamanhos na elevação dos seios maxilares: Um estudo histomorfométrico em coelhos.

Eduardo Pires Godoy¹, Karol Alí Apaza Alccayhuaman², Daniele Botticelli³, Andrea Amaroli⁴, Vitor Ferreira Balan⁵, Erick Ricardo Silva⁵, Samuel Porfirio Xavier⁵

¹ Departamento de Biologia Oral, Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

² Departamento de Biologia Oral, Universidade Médica de Viena, Viena, Austria.

³ Academia ARDEC, Rimini, Itália.

⁴ Departamento de Odontologia Ortopédica, Faculdade de Odontologia, Primeira Universidade médica Estadual de Moscou, Sechenov University, Moscou, Rússia.

⁵ Departamento de Cirurgia Bucomaxilofacial e Periodontia, Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Correspondência dos Autores:

Eduardo Pires Godoy: eduardo.godoy@usp.br

Karol Alí Apaza Alccayhuaman: caroline7_k@hotmail.com

Daniele Botticelli: daniele.botticelli@gmail.com

Andrea Amaroli: andrea.amaroli.71@gmail.com

Vitor Ferreira Balan: vitor.balan@usp.br

Erick Ricardo Silva: erickricardo.rp@gmail.com

Samuel Porfirio Xavier: spx@forp.usp.br

Palavras-chave: Estudo animal, elevação do assoalho sinusal, consolidação óssea, osteocondutividade, histologia, morfometria, membrana de colágeno, enxerto xenógeno.

GODOY, E.P. Osteocondutividade de grânulos de enxerto xenógeno bovino de diferentes tamanhos na elevação dos seios maxilares: Um estudo histomorfométrico em coelhos. [Dissertação - Mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2022.

RESUMO

Devido à falta de dados sobre o contato osso-enxerto ao longo do tempo nas várias regiões dentro do espaço subantral do assoalho do seio maxilar elevado, o objetivo do presente estudo foi avaliar a osteocondutividade do osso mineral bovino desproteínizado (Deproteinized bovine bone mineral - DBBM) com grânulos de dois diferentes tamanhos aplicados para elevação do assoalho do seio maxilar. O aumento do seio maxilar foi realizado bilateralmente em 18 coelhos usando DBBM com dimensões de partícula de 0,125-1,0 mm ou 1-2 mm. A antrostomia foi coberta com uma barreira de colágeno. Os animais foram eutanasiados em grupos de 6 após 2, 4 e 8 semanas de reparo. MicroCT e análises histológicas foram realizadas. Após 2 semanas de reparo, o contato osso-enxerto foi de 10,9% e 11,9% para os sítios de grânulos pequenos e grandes, respectivamente. Após 8 semanas de reparo, o contato osso-enxerto aumentou para 65% e 62% nos locais de grânulos pequenos e grandes, respectivamente. Os maiores valores localizaram-se próximos às paredes ósseas e à janela óssea. O conteúdo de osso novo desenvolveu-se entre 2 e 8 semanas de 7,0% a 27,6% e de 6,1% a 27,6% nos sítios de grânulos pequenos e grandes, respectivamente. Resultados semelhantes em osteocondutividade e formação óssea foram encontrados em sítios de grânulos de DBBM pequenos e grandes.

Palavras-chave: Estudo animal, elevação do assoalho do seio maxilar, consolidação óssea, osteocondutividade, histologia, morfometria, membrana de colágeno, enxerto xenógeno.

ABSTRACT

Due to the lack of data on bone-to-graft contact (BGC) over time in the various regions within the subantral space of the augmented sinus floor, the present study aimed to evaluate the osteoconductivity of deproteinized bovine bone mineral (DBBM) with granules of different sizes applied in maxillary sinus floor elevation. A maxillary sinus augmentation was performed bilaterally in 18 rabbits using DBBM with particle dimensions of either 0.125–1.0 mm or 1–2 mm. The antrostomy was covered using a collagen barrier. The animals were euthanized in groups of six after 2, 4, and 8 weeks of healing. MicroCT and histological analyses were performed. After 2 weeks of healing, BGC was 10.9% and 11.9% for the small and large granule sites, respectively. After 8 weeks of healing, the BGC increased to 65% and 62% at the small and large granule sites, respectively. The highest values were located close to the bony walls and the bony window. New bone content developed between 2 and 8 weeks from 7.0% to 27.6% and from 6.1% to 27.6% at the small and large granule sites, respectively. Similar outcomes in osteoconductivity and bone formation were found at both small and large DBBM granule sites.

Keywords: Animal study; sinus floor elevation; bone healing; osteoconductivity; histology; morphometry; collagen membrane; xenograft

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Quando o volume ósseo nas regiões posteriores da maxila não permite a instalação de implantes de comprimento adequado, um procedimento de elevação do assoalho do seio maxilar é frequentemente aplicado para aumentar a altura do osso disponível. Devido à tendência dos seios maxilares em re-pneumatizar ao longo do tempo após a elevação da membrana Schneideriana (ASAI et al., 2002; XU et al., 2004,2005; SCALA et al., 2010, 2012) diversos biomateriais têm sido aplicados com o objetivo de neutralizar essa re-pneumatização (CORBELLA et al., 2016).

Enxertos xenógenos que variam entre tamanho de partículas são amplamente usados como materiais de preenchimento (CORDARO et al., 2008; TESTORI et al., 2013; KAWAKAMI et al., 2018, 2019). Dependendo de sua estrutura, as partículas dos enxertos xenógenos serão reabsorvidas ao longo do tempo em taxas diferentes ou incorporadas aos tecidos recém-formados (CANEVA et al., 2017; IIDA et al., 2017; OMORI et al., 2018; MASUDA et al., 2019). Um osso mineral bovino desproteínizado (Deproteinized bovine bone mineral - DBBM) tem sido aplicado em vários estudos clínicos (CORDARO et al., 2008; TESTORI et al., 2013; LEE et al., 2017; DE MOLON et al., 2019) e experimentais (CANEVA et al., 2017; JENSEN et al., 2015; DE SANTIS et al., 2017; MASUDA et al., 2020) mostrando uma alta estabilidade volumétrica em comparação com outros biomateriais.

A influência do tamanho das partículas nos desfechos clínicos também foi avaliada. Em um estudo clínico randomizado (HOANG et al., 2012), uma técnica de preservação do rebordo foi utilizada posteriormente a extração de elemento dental.

Massa de matriz óssea desmineralizada humana foi usada como preenchimento. A massa continha partículas pequenas (0,125-0,710 mm) ou uma mistura de partículas de dimensões maiores (2-4 mm) e partículas pequenas. Nenhuma diferença clínica e histológica estatisticamente significativa foi encontrada entre os dois locais de aumento.

Em estudos clínicos randomizados, controlados e do tipo *split mouth* (DE MOLON et al., 2019; DOS ANJOS et al., 2016), dez pacientes parcialmente desdentados foram recrutados para elevação bilateral do assoalho do seio maxilar. Grânulos de tamanhos diferentes (0,125-1,0 mm ou 1-2 mm) de DBBM foram usados para preencher o espaço elevado no seio. Após 8 meses de reparo, 25 implantes foram instalados e as biópsias foram retiradas para análise histológica. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para a estabilidade do implante, medida após mais 6 meses de reparo, e com relação às proporções de biomaterial residual e osso recém-formado.

Esses resultados estão de acordo com os resultados de outros estudos clínicos (CHACKARTCHI et al., 2011) e animais (JENSEN et al., 2015) sobre elevação do assoalho do seio maxilar. No entanto, um outro estudo clínico (TESTORI et al., 2013) relatou grandes quantidades de formação de osso novo em locais reparados com partículas grandes, em comparação com locais reparados com partículas pequenas.

A integração das partículas de DBBM (contato osso-enxerto) também foi avaliada em seios maxilares elevados (CANEVA et al., 2017; JENSEN et al., 2015). Em um estudo em minipigs (JENSEN et al., 2015), apenas o contato osso-enxerto total foi avaliado, sem fornecer dados divididos para cada região. Em um estudo em coelhos (CANEVA et al., 2017), o contato osso-enxerto em várias regiões dos locais

enxertados foi avaliado após diferentes períodos de reparo. No entanto, apenas locais com pequenos grânulos de DBBM foram avaliados.

Devido à incerteza na seleção das dimensões do enxerto xenógeno a ser utilizado e à falta de informações sobre a osteocondutividade dos grânulos grandes estudados em diferentes locais da elevação do seio maxilar, surge o estudo da influência das dimensões das partículas de enxertos xenógenos nos resultados de reparo.

Assim, o objetivo do presente estudo experimental foi avaliar a osteocondutividade de osso mineral bovino desproteínizado com grânulos de diferentes tamanhos, aplicados na elevação do assoalho do seio maxilar.

A hipótese nula foi a de que não houve diferença na osteocondutividade e na formação óssea nos locais elevados com grânulos pequenos ou grandes de osso mineral bovino desproteínizado (DBBM).

2. PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi de avaliar a osteocondutividade do osso mineral bovino desproteinizado com grânulos de diferentes tamanhos, aplicados em elevação do assoalho do seio maxilar de coelhos.

3. *MATERIAL E MÉTODOS*

3 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP, SP-Brasil; 2017.1.278.58.9 – Anexo 1). O estudo é relatado de acordo com as diretrizes ARRIVE. As diretrizes para cuidados com os animais adotadas no Brasil foram rigorosamente seguidas.

3.1 Seleção da amostra

Foram utilizados 18 coelhos brancos da raça *New Zealand*, com aproximadamente 3,5-4,0 kg e 4-5 meses de idade. Três grupos de seis animais cada foram atribuídos aleatoriamente a um período diferente de reparo, ou seja, 2, 4 e 8 semanas, respectivamente. Para cumprir os requisitos dos Três R para pesquisa em animais, um modelo de coelho foi selecionado devido à simplicidade do tratamento cirúrgico. Além disso, o uso do desenho de boca dividida reduziu a variabilidade entre os animais, diminuindo o número de animais necessários.

No entanto, para o cálculo amostral, foram utilizados os dados de um experimento em minipigs (JENSEN et al., 2015). Nesse experimento, uma diferença de 9,1% no contato osso-enxerto foi encontrada após 6 semanas de reparo em favor de sítios de grânulos pequenos em comparação à grânulos grandes. Com um desvio padrão de 6%, seis coelhos foram calculados como suficientes para rejeitar a hipótese nula com um poder de 0,8 e um $\alpha = 0,05$.

3.2 Randomização

A randomização para colocação de grânulos de xenoenxerto de diferentes dimensões foi realizada de forma digital (www.randomization.com) por um autor não

envolvido nas cirurgias. O cirurgião foi informado sobre o lado (direito ou esquerdo) de aplicação do enxerto xenógeno após a elevação de ambos os seios maxilares. Nenhuma indicação foi relatada nas lâminas histológicas em relação aos locais de teste e controle. No entanto, as diferentes dimensões dos grânulos podem ter fornecido pistas para diferenciar os dois locais, embora nenhuma indicação sobre o objetivo do estudo tenha sido dada ao avaliador histológico.

3.3 Procedimentos cirúrgicos

Um cirurgião especialista realizou todas as cirurgias. A anestesia foi induzida com acepromazina (1,0 mg / kg; Acepran®, Vetnil, Louveira, São Paulo, Brasil), administrada por via subcutânea e uma mistura de xilazina (3,0 mg / Kg; Dopaser®, Hertape Calier, Juatuba, Minas Gerais, Brasil.) e cloridrato de cetamina 50mg / kg (Ketamin Agener, União Química Farmacêutica Nacional S / A, Embu-Guaçú, São Paulo, Brasil) foram utilizadas para anestesia. A anestesia local foi realizada nas regiões experimentais.

Após realização de tricotomia e antisepsia da área experimental, uma incisão de 2,5 cm de comprimento foi realizada ao longo da linha média do dorso nasal. Pele, músculos e periósteo foram rebatidos e o osso nasal foi exposto bilateralmente na sutura naso-incisal. Uma antrostomia quadrada, com 4 mm de dimensões, foi confeccionada com brocas diamantadas em ambos os lados, lateralmente à sutura naso-incisal e anteriormente à sutura nasofrontal (Figura 1A). A mucosa dos seios maxilares foi descolada das paredes ósseas e elevadas em ambos os lados. Um pequeno parafuso foi colocado na sutura naso-incisal como referência para o processamento

histológico e para identificação da posição central das antrostomias. Grânulos de osso mineral bovino desproteinizado (DBBM) (Bio-Oss®, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, LU, Suíça), 0,250-1,0 mm ou 1,0-2,0 mm, foram alocados aleatoriamente e enxertados no espaço elevado em volumes iguais (Figura 1B). As antrostomias foram posteriormente cobertas com barreiras de colágeno (BioGide® Geistlich Biomaterials, Wolhusen, LU, Suíça) (Figura 1C).

Suturas reabsorvíveis foram utilizadas para o perióstio (Polyglactin 910 5-0, Vicryl®, Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil) enquanto suturas de nylon foram utilizadas para fechar os retalhos cutâneos (Ethilon 4-0®, Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil).



Figura 1. Vista dos procedimentos clínicos na região experimental. (A) Uma antrostomia de 3,5–4 mm foi preparada em ambos os lados, lateralmente à sutura naso-incisal e anteriormente à sutura nasal-frontal. (B) Grânulos minerais de osso bovino desproteinizado 0,250-1,0 mm ou 1,0-2,0 mm foram alocados aleatoriamente e enxertados dentro do espaço elevado em quantidades iguais. (C) As antrostomias foram posteriormente cobertas com barreiras de colágeno.

3.4 Manutenção dos animais

Cada animal foi mantido em gaiola individual (1 animal/4500 cm²) e em sala climatizada com ar condicionado Split (21° C) sem controle de umidade, com 34 trocas de ar/hora. Controle de iluminação automático de 12/12h. As feridas e as funções biológicas foram cuidadosamente monitoradas por médicos

veterinários durante todo o período do experimento. Os animais tiveram acesso a comida e água filtrada *ad libitum*.

3.5 Eutanásia

Os mesmos procedimentos para induzir a anestesia durante a cirurgia também foram aplicados para a eutanásia. Uma overdose de tiopental sódico (1,0 g, 2mL, Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, Itapira, São Paulo, Brasil) foi utilizada para a eutanásia dos animais. As biópsias foram retiradas em blocos e fixadas em formalina tamponada a 10%.

3.6 Avaliação Microtomográfica

Uma análise microCT foi realizada usando um equipamento microCT 1172 (Bruker, Kontich, Bélgica). Os parâmetros seguidos foram: pixel isotrópico de 9,92 μm , 60KV / 165 μA , filtro Al 0,5 mm, tempo de exposição 596 ms, etapa de rotação 0,4 graus, média de quadro 4 e movimento aleatório 10. O software DataViewer® (Bruker, Kontich, Bélgica) foi usado para reposicionar as imagens transversais e as medições foram realizadas com o software CTan (Bruker, Kontich, Bélgica). Todas as avaliações foram realizadas por um autor calibrado. (Figura 2).



Figura 2. O microtomógrafo SkyScan® 1172 (Bruker, Kontich, Bélgica) do Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos e Biomateriais (LAB 3D BIO) da FORP-USP foi utilizado para escaneamento das peças. (Fonte:www.bruker.com/pt/products/microtomography).

3.7 Preparação histológica

A região experimental foi reduzida e as biópsias desidratadas em concentrações crescentes de etanol. Posteriormente, as biópsias foram infiltradas em resina (LR White™ hard grid, London Resin Co Ltd, Berkshire, UK). Após a polimerização, foram preparadas duas secções retificadas utilizando o parafuso como referência e seguindo um plano transversal.

As secções base foram inicialmente preparadas com uma largura de cerca de 100-150µm usando um equipamento de corte de precisão (Exakt®, Apparatebau, Norderstedt, Alemanha) e, em seguida, foram reduzidas para cerca de 50-60µm usando uma máquina de corte e retifica (Exakt®, Apparatebau, Norderstedt, Alemanha). As secções foram coradas com azul de toluidina ou azul de Stevenel e vermelho de alizarina.

3.8 Calibração para avaliações histomorfométricas

Todas as medidas histológicas foram realizadas por avaliador treinado após calibração com outro profissional realizada até que a concordância interexaminadores no reconhecimento dos tecidos atingisse $K > 0,90$.

3.9 Avaliações histomorfométricas

As medidas histológicas foram realizadas utilizando o software NISElements D (v 4.0, Laboratory Imaging, Nikon Corporation, Tóquio, Japão) em um microscópio Eclipse Ci (Nikon Corporation, Tóquio, Japão) equipado com uma câmera de vídeo (Digital Sight DS- 2Mv, Nikon Corporation, Tóquio, Japão).

A área elevada do seio maxilar foi avaliada em todos os três períodos de reparo, enquanto os defeitos residuais na antrostomia foram medidos no período de 8 semanas de reparo.

As seguintes regiões dentro do espaço aumentado foram analisadas (Figura 3): (i) próximo às paredes ósseas medial e lateral (regiões da parede óssea), (ii) no centro do seio elevado, (iii) subjacente a mucosa do seio (região submucosa), (iv) e nas proximidades da antrostomia, ainda dentro do seio maxilar (região próxima à janela). A antrostomia (região da antrostomia) foi avaliada em três zonas diferentes: próximo às margens lateral e medial e no centro da antrostomia.

Para realizar medidas morfométricas, um procedimento de contagem de pontos foi usado (CHACKARTCHI et al., 2011). Quadriculados com quadrados de 75µm de dimensões foram sobrepostos à imagem da lâmina histológica com aumento de 100x. As proporções dos seguintes tecidos foram incluídas nas análises: osso mineralizado, espaços medulares, matriz tecidual densa e frouxa, tecido conjuntivo, enxerto xenógeno, células inflamatórias, osteoclastos, vasos e resíduos de membrana.

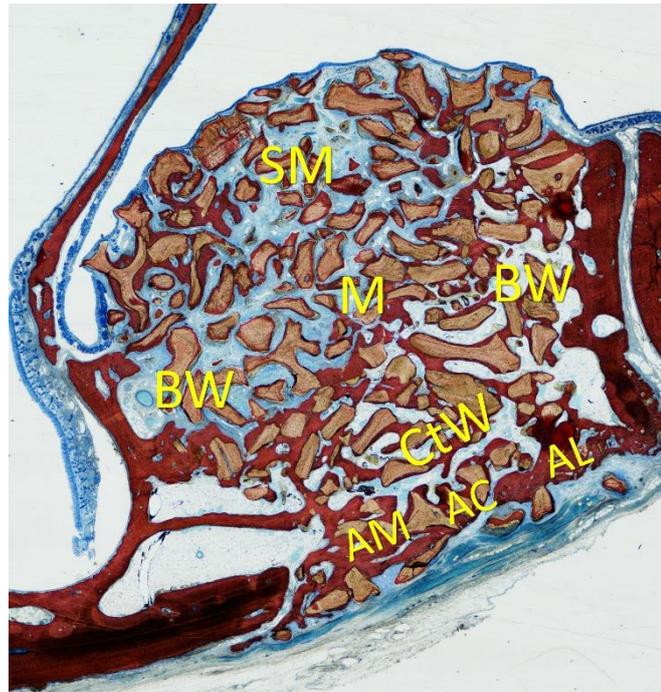


Figura 3. Regiões a serem analisadas na elevação de seio maxilar (PC = paredes ósseas; M = médio; SM = submucosa; CtW = perto da janela) e a região da antrostomia (AL = lateral; AM = margem medial; AC = centro da antrostomia).

Como medidas lineares, os seguintes tecidos em contato com a superfície do enxerto xenógeno foram avaliados em uma ampliação de x100: osso mineralizado, espaços medulares, tecidos de matriz densa e frouxa, osteoclastos e vasos. Além disso, foram mensurados a área do seio maxilar enxertado e dos defeitos residuais na parte externa da antrostomia.

Como objetivo exploratório, o ponto de intersecção (SCHROEDER et al., 1973) foi avaliado entre o tecido denso e o osso neoformado em contato com a superfície do enxerto (contato osso-enxerto) (JENSEN et al., 2015).

3.10 Análise de dados

Um relatório sobre a comparação dos dados combinados de ambos os tamanhos de grânulos em relação apenas às proporções de osso novo e de resíduos de grânulos de DBBM nas análises histológicas e microCT já havia sido

publicado (BOTTICELLI & LANG., 2017). No presente estudo, a variável de desfecho primário foi a osteocondutividade expressa pela porcentagem de contato osso-enxerto como dados totais e para as regiões avaliadas. O conteúdo em porcentagens de osso novo, de DBBM e dos outros tecidos foi relatado separadamente para grânulos pequenos e grandes. Para a análise microCT, apenas as mudanças volumétricas ao longo do tempo foram relatadas.

O osso mineralizado total foi usado como variável secundária. Valores médios e desvios-padrão foram relatados para cada resultado. Todos os cálculos foram realizados no software Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA). As análises estatísticas foram realizadas para as variáveis primárias e secundárias usando o software IBM SPSS Statistics (IBM Inc., Chicago, IL, EUA). O teste de Wilcoxon foi usado para avaliar as diferenças entre sítios de partículas grandes e pequenas. O nível de significância adotado foi de 5%.

4. *RESULTADOS*

4 RESULTADOS

Nenhuma perfuração da mucosa foi observada durante os procedimentos cirúrgicos. Todas as biópsias foram coletadas e processadas histologicamente, e um $n = 6$ foi obtido para cada período de reparo.

Os volumes avaliados no microCT (Figura 4A-C) foram cerca de 132 mm^3 , 114 mm^3 , 115 mm^3 nos locais com grânulos grandes, 123 mm^3 , 104 mm^3 , 118 mm^3 nos locais com grânulos pequenos após 2, 4 e 8 semanas, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os sítios de grânulos grandes e pequenos em qualquer um dos três períodos de reparo analisados.



Figura 4. Imagens MicroCT 3D que representam o seio aumentado utilizando grânulos de 0,125–1 mm e 1–2 mm após 2 (A), 4 (B) e 8 (C) semanas de reparo.

As análises histológicas (Figura 5A-C) mostraram que a área enxertada diminuiu ligeiramente ao longo do tempo em ambos os locais de elevação do seio maxilar, de $17,5 \pm 3,8 \text{ mm}^2$, $16,5 \pm 2,0 \text{ mm}^2$ e $14,6 \pm 1,0 \text{ mm}^2$ nos locais de partículas pequenas, e de $17,1 \pm 2,3 \text{ mm}^2$, $16,6 \pm 2,5 \text{ mm}^2$ e $15,3 \pm 3,1 \text{ mm}^2$ nos locais de partículas grandes, após 2, 4 e 8 semanas, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os locais e entre os períodos de reparo. Pequenos defeitos residuais na parte externa da antrostomia

estavam presentes após 8 semanas de reparo nos locais de partículas pequenas ($0,3 \pm 0,2 \text{ mm}^2$) e grandes ($0,4 \pm 0,3 \text{ mm}^2$). Também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os locais.



Figura 5. Secções retificadas representando o seio aumentado utilizando grânulos de 0,125-1 mm e 1–2 mm após 2 (A), 4(B), e 8 (C) semanas de reparo. Imagens tiradas originalmente com objetiva $\times 10$. Azul de Stevenel e vermelho de alizarina.

Após 2 semanas de reparo (Figura 6A, B), nas análises histológicas do conteúdo dos seios elevados (Tabela 1), o osso foi encontrado em percentuais de $7,0 \pm 4,5\%$ nos sítios de grânulos pequenos e $6,3 \pm 3,4\%$ nos sítios de grânulos grandes ($p = 0,686$). O enxerto xenógeno ocupava cerca de 50% da área em ambos os locais ($p = 0,753$). Matriz de tecido denso foi encontrado em cerca de 20% em ambos os locais ($p = 0,917$) ao redor dos grânulos do enxerto, enquanto matriz de tecido frouxo foi interposto entre os grânulos. Observou-se formação de osso novo dentro dos grânulos e em contato próximo com as superfícies do enxerto xenógeno (Tabela 2). As porcentagens de tecidos em contato com o enxerto xenógeno foram representadas principalmente por tecido denso ($\sim 70\%$), enquanto o osso neoformado estava cobrindo 11-12% ($p = 0,753$) das superfícies. O osso foi encontrado em porcentagens mais elevadas nas regiões da parede óssea (Tabela 3). Os osteoclastos foram encontrados em porcentagens de $\sim 5\%$ ($p = 0,462$).

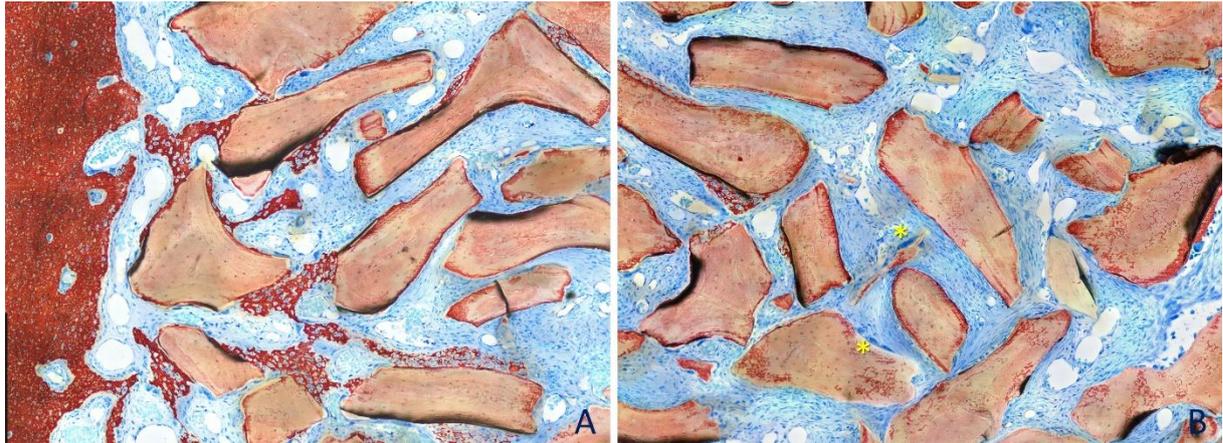


Figura 6. Fotomicrografias de seções de solo representando o reparo após 2 semanas em locais de pequenos grânulos. (A) Novo osso foi encontrado formado próximo às paredes ósseas e forro na superfície do DBBM. (B) Um alcance de tecido denso em células semelhantes a fibroblastos foi visto em torno das partículas de DBBM. Um tecido solto, alcance em vasos, foi interposto entre as partículas. Algumas células multicelulares eram visíveis (por exemplo, *). Ampliação original x200. Azul Stevenel e vermelho de alizarina.

Tabela 1. Componentes do tecido dentro dos seios elevados em três períodos de avaliação. Valores médios (em negrito) \pm desvios padrão; mediana em porcentagens.

		New Bone	Marrow Spaces	DBBM	Dense Tissue	Loose Tissue	Vessels	Other Tissues
2 weeks	Small granules	7.0 \pm 4.5; 6.6	2.4 \pm 2.9; 1.8	50.6 \pm 6.4; 51.5	20.2 \pm 3.6; 20.1	12.9 \pm 5.2; 12.8	2.9 \pm 2.1; 2.6	4.0 * \pm 7.1; 1.2
	Large granules	6.3 \pm 3.4; 5.4	3.2 \pm 1.8; 2.7	52.6 \pm 7.9; 52.4	20.3 \pm 2.5; 19.7	14.6 \pm 4.9; 15.9	2.6 \pm 2.1; 2.1	0.4 * \pm 0.2; 0.3
4 weeks	Small granules	16.7 \pm 3.4; 16.9	11.3 \pm 9.8; 8.3	48.5 \pm 4.7; 47.5	12.8 \pm 7.8; 12.2	6.4 \pm 3.6; 6.7	3.8 \pm 1.4; 4.0	0.3 \pm 0.4; 0.2
	Large granules	18.4 \pm 6.0; 18.4	11.1 \pm 7.4; 9.5	43.5 \pm 3.2; 42.1	12.9 \pm 5.7; 11.6	8.3 \pm 2.3; 8.3	5.4 \pm 2.2; 4.4	0.3 \pm 0.3; 0.2
8 weeks	Small granules	27.6 \pm 4.6; 27.2	16.4 \pm 5.0; 16.3	46.3 \pm 3.4; 46.1	6.3 \pm 4.4; 5.7	2.5 \pm 2.0; 2.6	0.7 \pm 0.5; 0.5	0.1 \pm 0.3; 0.0
	Large granules	27.6 \pm 4.8; 27.0	19.2 \pm 3.8; 18.6	44.3 \pm 5.0; 43.8	4.2 \pm 3.4; 5.1	3.1 \pm 4.0; 1.2	1.3 \pm 0.7; 1.3	0.3 \pm 0.5; 0.0

* $p < 0.05$ between test and control sites.

Tabela 2. Tecidos em contato com a superfície do DBBM nos três períodos de avaliação. Valores médios (em negrito) \pm desvios padrão; mediana em porcentagens.

		New Bone	Marrow Spaces	Dense Tissue	Loose Tissue	Vessels	Osteoclasts
2 weeks	Small granules	10.9 \pm 6.3; 12.5	1.0 \pm 1.1; 0.9	70.9 \pm 9.1; 73.3	12.6 \pm 5.5; 14.1	0.1 \pm 0.2; 0.0	4.6 \pm 3.7; 3.5
	Large granules	11.9 \pm 5.9; 11.5	1.5 \pm 0.9; 1.7	69.6 \pm 7.4; 71.4	11.5 \pm 5.1; 11.4	0.3 \pm 0.5; 0.0	5.1 \pm 3.4; 3.9
4 weeks	Small granules	48.6 \pm 13.1; 46.3	11.7 \pm 10.4; 8.3	35.0 \pm 16.2; 34.4	2.6 \pm 2.2; 2.1	0.0 \pm 0.0; 0.0	2.2 \pm 2.1; 1.6
	Large granules	49.1 \pm 18.2; 48.3	10.8 \pm 9.1; 8.5	35.5 \pm 19.7; 32.7	2.2 \pm 2.2; 1.6	0.0 \pm 0.0; 0.0	2.4 \pm 2.3; 1.9
8 weeks	Small granules	65.0 \pm 7.3; 65.9	16.9 \pm 3.7; 17.7	15.0 \pm 8.1; 13.8	2.2 \pm 2.1; 1.9	0.0 \pm 0.0; 0.0	0.9 \pm 0.6; 0.9
	Large granules	62.0 \pm 8.7; 61.8	15.6 \pm 5.8; 15.0	21.0 \pm 10.0; 18.3	0.5 \pm 0.6; 0.3	0.0 \pm 0.0; 0.0	0.9 \pm 0.6; 0.8

$p < 0.05$ between test and control sites.

Tabela 3. BGC nas várias regiões avaliadas dentro do seio elevado nos três períodos de avaliação. Valores médios (em negrito) \pm desvios padrão; mediana em porcentagens.

	Small Granules			Large Granules		
	2 Weeks	4 Weeks	8 Weeks	2 Weeks	4 Weeks	8 Weeks
Bone walls	23.6 \pm 14.2; 29.6	67.0 \pm 8.2; 69.8	73.4 \pm 6.2; 73.2	20.1 \pm 7.7; 17.4	63.2 \pm 19.2; 67.7	67.1 \pm 8.1; 67.2
Schneiderian	6.2 \pm 13.8; 0.0	25.1 \pm 22.1; 25.4	40.8 \pm 18.1; 45.0	9.5 \pm 12.7; 4.3	31.7 \pm 22.3; 32.9	54.5 \pm 24.9; 57.6
Middle zone	2.4 \pm 5.4; 0.0	42.9 \pm 23.1; 39.6	64.0 \pm 20.6; 70.0	11.9 \pm 15.6; 4.8	29.6 \pm 23.9; 24.1	49.1 \pm 22.0; 53.1
Close window	3.1 \pm 4.8; 0.0	47.2 \pm 15.3; 52.8	74.8 \pm 4.6; 76.9	0.0 \pm 0.0; 0.0	52.0 \pm 24.4; 60.4	71.9 \pm 8.7; 74.5
Full area	10.9 \pm 6.3; 12.5	48.6 \pm 13.1; 46.3	65.0 \pm 3.7; 65.9	11.9 \pm 5.9; 11.5	49.1 \pm 18.2; 48.3	62.0 \pm 8.7; 61.8

$p < 0.05$ between test and control sites.

Após 4 semanas de reparo (Tabela 1; Figura 6A, B), o osso neoformado ocupava 17-18% ($p = 0,173$) das áreas analisadas, e o enxerto xenógeno ainda ocupava ~ 44-49% dessa área ($p = 0,116$). As proporções de tecido denso diminuíram para ~ 13% ($p = 0,917$). Os tecidos em contato com as superfícies do enxerto (Tabela 2) agora eram representados principalmente por osso recém-formado (~ 49%; $p = 0,753$), enquanto as proporções de tecido denso foram reduzidas para ~ 35-36% ($p = 0,674$). As proporções de osteoclastos também diminuíram para ~ 2% ($p = 0,395$).

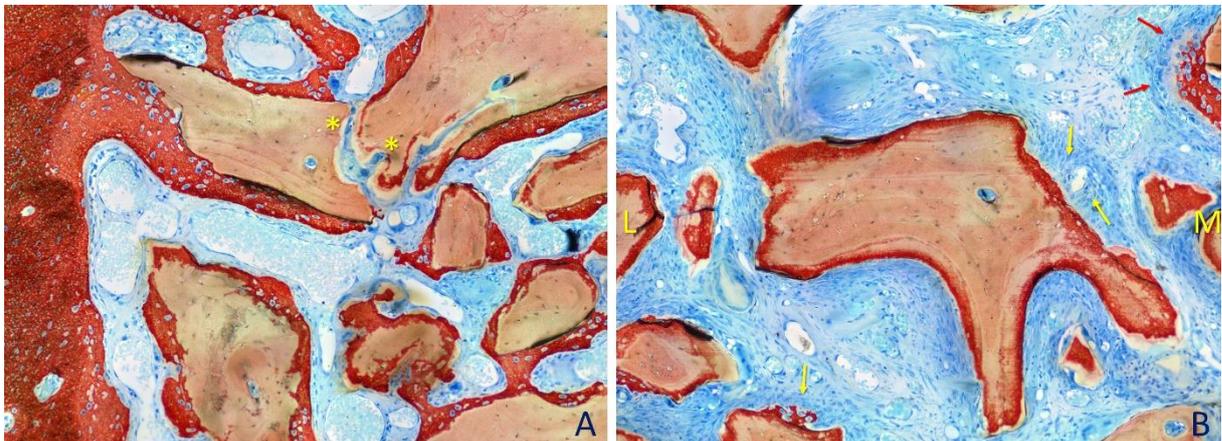


Figura 7. Fotomicrografias que representam o reparo após 4 semanas em sítios de grânulos grandes. (A) Região das paredes ósseas. Maior quantidade de osso novo foi encontrado em comparação ao período anterior analisado. Algumas células multicelulares ainda eram visíveis (por exemplo, *). (B) O osso novo atingiu com o tempo as regiões mais centrais, formando a partir das paredes ósseas lateral (L) e mesial (M) do seio maxilar. O grânulo do centro apresenta maior cromaticidade periférica em relação ao período de reparo anterior. Além disso, parte do tecido denso ao redor do grânulo parecia ter um maior conteúdo de células ativas, especialmente em zonas onde se formou novo osso entre a superfície do enxerto e o aglomerado celular (setas amarelas). Observa-se uma frente de formação de osso novo e tecido osteóide (setas vermelhas). Ampliação original x200. Azul de Stevenel e vermelho de alizarina.

Após 8 semanas de reparo (Tabela 1; Figura 8A, B), o osso novo dentro da área enxertada aumentou ainda mais, para ~ 28% ($p = 0,753$) em ambos os locais de grânulos pequenos e grandes, enquanto o tecido denso foi reduzido para 4-6% ($p = 0,173$). As porcentagens de enxerto foram semelhantes às dos períodos de

reparo anteriores. O osso novo em contato com o enxerto (Tabela 2) estava cobrindo $65 \pm 7,3\%$ da superfície nos locais dos grânulos pequenos e $62 \pm 8,7\%$ nos locais dos grânulos grandes ($p = 0,345$). As porcentagens correspondentes de tecido denso foram de $15,0 \pm 8,1\%$ e $21,0 \pm 10\%$ nos sítios de grânulos pequenos e grandes, respectivamente. Osteoclastos foram encontrados em porcentagens $<1\%$.

Tabela 4. Pontos de intersecção entre o osso recém-formado e o tecido denso. Dias (em negrito) e porcentagem de BGC são relatados.

	Bone Walls	Schneiderian	Middle Zone	Close Window	Full Area
Small granules	19.5 ; 40.6%	55.9 ; 40.8%	28.6 ; 44.5%	26.1 ; 41.1%	25.4 ; 41.6%
Large granules	20.8 ; 41.2%	43.2 ; 44.0%	47.3 ; 43.0%	24.6 ; 39.5%	25.3 ; 42.0%

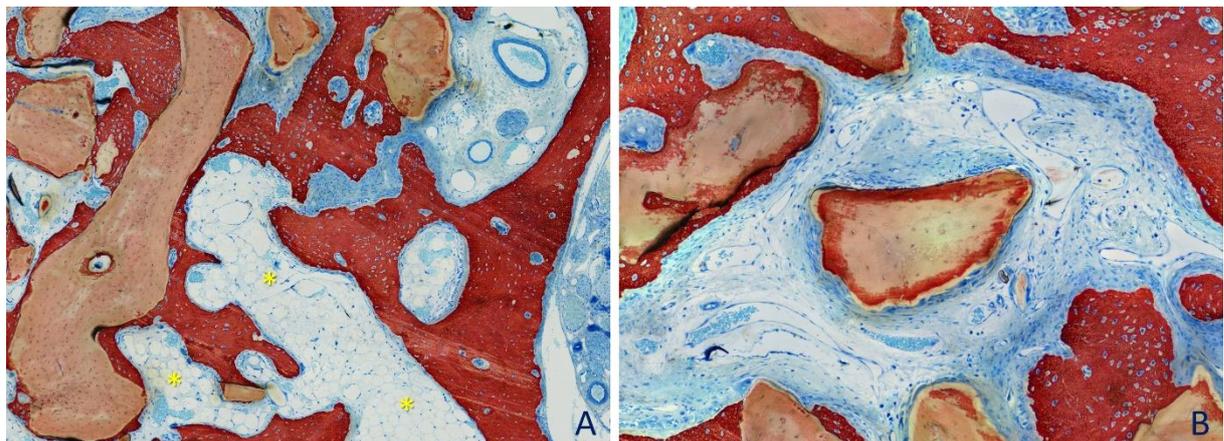


Figura 8. Fotomicrografias de seções que representam o reparo após 8 semanas em sítios de pequenos grânulos. (A) Espaços medulares foram observados neste estágio de cura (asteriscos amarelos). (B) Uma partícula com cromaticidade aumentada, ainda não alcançada por osso recém-formado. Ampliação original $\times 200$. Azul de Stevenel e vermelho de alizarina.

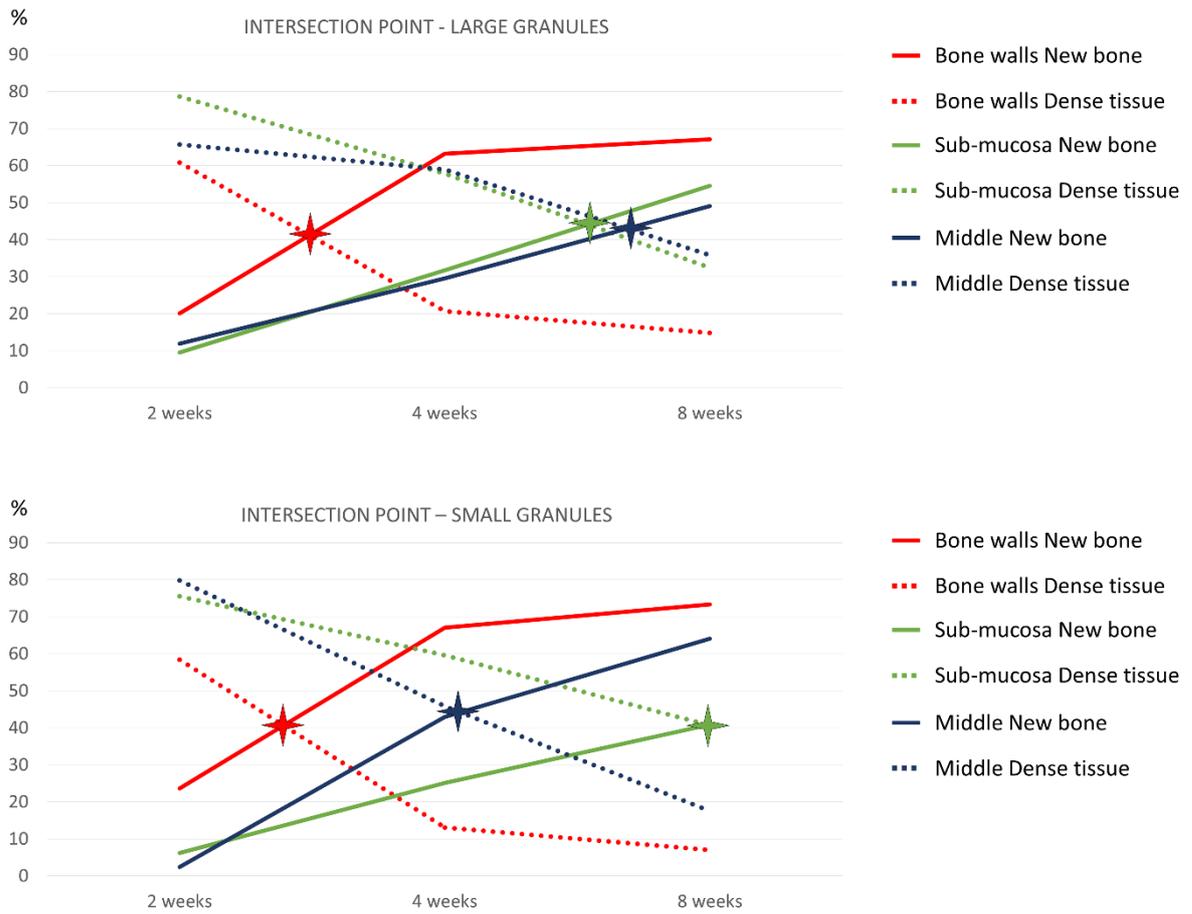


Gráfico 1. Gráficos que representam as porcentagens de contato osso- enxerto e tecido denso em contato com a superfície do enxerto nas várias regiões e períodos avaliados. As estrelas indicam o ponto de intersecção entre o novo osso e o tecido denso.

5. *DISCUSSÃO*

5 DISCUSSÃO

O objetivo do presente experimento foi avaliar a osteocondutividade de osso mineral bovino desproteínizado (DBBM) com grânulos de diferentes tamanhos utilizados para aumento do assoalho do seio maxilar. Como objetivo secundário, a formação óssea nos locais enxertados deveria ser avaliada. Não foram encontradas diferenças em termos de formação de osso novo e contato osso-enxerto.

A novidade incluída no presente estudo foi representada pela avaliação sequencial do contato osso-enxerto nas várias regiões do seio para grânulos pequenos e grandes. Além disso, vários tecidos não analisados em outros estudos que compararam grânulos pequenos e grandes foram levados em consideração tanto dentro dos seios maxilares elevados quanto em contato com os grânulos do enxerto.

Após 2 semanas de reparo, os tecidos em contato com as superfícies do DBBM eram representados principalmente por tecido denso que circundava cerca de 70% das superfícies de ambos os enxertos, enquanto o osso novo era representado por 11-12%. As maiores quantidades de contato osso-enxerto foram observadas próximo às paredes ósseas (20-24%) em ambos os locais de elevados. Isso está de acordo com um estudo experimental em minipigs (BUSENLECHNER et al., 2009) que mostrou um gradiente de incorporação do enxerto maior na região próxima às paredes ósseas.

No presente estudo, o osso novo em contato com o enxerto xenógeno aumentou durante os períodos seguintes de reparo, atingindo frações de 62-65% após 8 semanas, enquanto os tecidos densos foram reduzidos correspondentemente. Esses resultados estão de acordo com os de outro estudo em

coelhos no qual grânulos pequenos de DBBM ou uma esponja de colágeno foram usados para elevar o assoalho do seio maxilar em coelhos. Nesse estudo, o reparo foi avaliado após 7, 14, 21 e 40 dias (CANEVA et al., 2017). Após 40 dias de reparo, foi encontrado 68,1% de contato osso-enxerto. Também foi demonstrado que o maior contato do osso com os grânulos de DBBM nas fases iniciais do reparo estava localizado próximo às paredes ósseas. Além disso, quando os dados representativos da porcentagem do osso total (osso mineralizado e espaços medulares) e dos tecidos moles (tecidos densos e frouxos) foram ilustrados em um gráfico, as linhas que representam as porcentagens nos vários períodos analisados se interceptaram em diferentes períodos. A primeira interseção ocorreu nas regiões próximas às paredes ósseas, seguidas pelas regiões intermediária e submucosa. Isso pode ser interpretado como se a formação óssea nas superfícies do DBBM partisse das paredes ósseas e se direcionasse às demais regiões devido às propriedades osteocondutoras do biomaterial. Também no presente estudo, gráficos semelhantes foram elaborados, porém, utilizando apenas os dados de osso novo e tecidos densos. Nos sítios de grânulos pequenos, resultados análogos ao estudo anterior (CANEVA et al., 2017) foram observados. No entanto, para os sítios de grânulos grandes, um ponto de intersecção atrasado para a região central foi encontrado em comparação com os sítios de grânulos pequenos, de modo que o ponto de intersecção foi semelhante ao observado na região da Submucosa. Isso, por sua vez, pode indicar uma maior osteocondutividade de partículas de DBBM pequenas versus grandes na porção central da região enxertada. No entanto, a quantidade total de contato osso-enxerto em todas as regiões foi semelhante. Esses achados não estão de acordo com os de um estudo em minipigs (JENSEN et al., 2015) no qual partículas grandes ou pequenas de DBBM, semelhantes às aplicadas no

presente experimento, foram usadas para elevação do assoalho do seio maxilar. Os implantes foram instalados imediatamente e os animais foram sacrificados após 6 ou 12 semanas. A área enxertada total foi analisada, e uma proporção maior de contato osso-enxerto foi observada no grânulo pequeno em comparação com os locais dos grânulos grandes nas fases iniciais do reparo.

No presente estudo, dentro da área elevada, o padrão de reparo dos vários tecidos examinados nos vários períodos foi semelhante em ambos os locais de elevação. O osso novo aumentou em ambos os locais de 6-7% para cerca de 28% entre 2 e 8 semanas de reparo. Durante o mesmo período de observação, o enxerto foi reduzido em porcentagens de cerca de 51-53% para 44-46%. Esses achados corroboram aqueles relatados por outros estudos experimentais que mostraram um aumento da formação óssea e uma diminuição da porcentagem de enxerto de osso mineral bovino desproteínizado (DBBM) ao longo do tempo (JENSEN et al., 2015; CAVEVA et al., 2017; DE SANTIS et al., 2017).

Uma avaliação histológica do reparo no seio maxilar enxertado com grânulos pequenos ou grandes de DBBM foi realizada em estudos experimentais (JENSEN et al., 2017) e clínicos (CHACKARTCHI et al., 2011; TESTORI et al., 2017; DE MOLON et al., 2019).

Em um experimento de minipig (JENSEN et al., 2017), a fração de osso novo encontrada após 6 semanas foi de 39,0% para os sítios de grânulos pequenos e 40,0% para os sítios de grânulos grandes. Essas frações aumentaram para 44,3% e ~ 45,1% para os sítios de grânulos pequenos e grandes após 12 semanas, respectivamente. Por sua vez, os percentuais de DBBM diminuíram de 25,1% para 21,3% para os sítios de grânulos pequenos e de 24,6% para 19,8% para os sítios de grânulos grandes. Em concordância com esse estudo, os resultados do presente

estudo permitiram concluir que o tamanho dos grânulos não influenciou a neoformação óssea ou a degradação do DBBM em sítios elevados.

Em um estudo clínico randomizado (CHACKARTCHI et al., 2011), após 6 a 9 meses de reparo, a fração de osso e DBBM foi de 28,0% e 34,6% nos grânulos pequenos e 27,1% e 33,7% nos locais dos grânulos grandes, respectivamente. Nenhuma diferença foi encontrada entre os sítios.

Em outro estudo RCT (DE MOLON et al., 2019), 10 pacientes foram recrutados para uma elevação bilateral do assoalho do seio maxilar. Após 8 meses de reparo, a fração de osso novo era de 36,1% e 23,8% e a fração de DBBM era de 32,3% e 38,6%, nos sítios de grânulos pequenos e grandes, respectivamente. Novamente, as diferenças não foram estatisticamente significativas.

Porém, em outro ECR multicêntrico (TESTORI et al., 2017), resultados diferentes foram obtidos para a fração de osso novo. Após 6-8 meses, as biópsias foram coletadas de 11 pacientes. Os sítios de pequenos grânulos apresentaram 18,8% de osso novo e 21,7% de DBBM. Os sítios de grânulos grandes exibiram proporções significativamente maiores de osso novo de 26,8% e 20,0% de DBBM. Obviamente, as biópsias recuperadas não representam todo o espectro da área enxertada. Além disso, os resultados do período de observação desse estudo não podem ser realmente comparados com os resultados do presente estudo.

A principal limitação do presente estudo foi a utilização de animais filogeneticamente inferiores aos humanos e o pequeno tamanho da amostra para cada período de reparo analisado. As pequenas dimensões dos seios maxilares em comparação com os grânulos do enxerto xenógeno também podem representar outra limitação do estudo. (CHACKARTCHI et al., 2011; TESTORI et al., 2017; DE MOLON et al., 2019).

6. CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que desempenhos osteocondutores semelhantes e proporções semelhantes de osso novo foram observados nas várias regiões dos seios maxilares elevados com grânulos de enxerto xenógeno pequenos ou grandes. Portanto, grânulos pequenos e grandes de DBBM podem ser recomendados para aumento do assoalho do seio maxilar.

7. REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

1. Asai, S.; Shimizu, Y.; Ooya, K. Maxillary sinus augmentation model in rabbits: Effect of occluded nasal ostium on new bone formation. *Clin. Oral Implant. Res.* 2002, 13, 405–409.
2. Xu, H.; Shimizu, Y.; Asai, S.; Ooya, K. Grafting of deproteinized bone particles inhibits bone resorption after maxillary sinus floor elevation. *Clin. Oral Implant. Res.* 2004, 15, 126–133.
3. Xu, H.; Shimizu, Y.; Ooya, K. Histomorphometric study of the stability of newly formed bone after elevation of the floor of the maxillary sinus. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2005, 43, 493–499.
4. Scala, A.; Botticelli, D.; Rangel, I.G., Jr.; de Oliveira, J.A.; Okamoto, R.; Lang, N.P. Early healing after elevation of the maxillary sinus floor applying a lateral access: A histological study in monkeys. *Clin. Oral Implant. Res.* 2010, 21, 1320–1326.
5. Scala, A.; Botticelli, D.; Faeda, R.S.; Garcia Rangel, I., Jr.; de Oliveira, J.A.; Lang, N.P. Lack of influence of the Schneiderian membrane in forming new bone apical to implants simultaneously installed with sinus floor elevation: An experimental study in monkeys. *Clin. Oral Implant. Res.* 2012, 23, 175–181.
6. Corbella, S.; Taschieri, S.; Weinstein, R.; Del Fabbro, M. Histomorphometric outcomes after lateral sinus floor elevation procedure: A systematic review of the literature and meta-analysis. *Clin. Oral Implant. Res.* 2016, 27, 1106–1122.
7. Cordaro, L.; Bosshardt, D.D.; Palattella, P.; Rao, W.; Serino, G.; Chiapasco, M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: Histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin. Oral Implant. Res.* 2008, 19, 796–803.
8. Testori, T.; Wallace, S.S.; Trisi, P.; Capelli, M.; Zuffetti, F.; Del Fabbro, M. Effect of xenograft (ABBM) particle size on vital bone formation following maxillary sinus augmentation: A multicenter, randomized, controlled, clinical histomorphometric trial. *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* 2013, 33, 467–475.
9. Kawakami, S.; Lang, N.P.; Iida, T.; Ferri, M.; Apaza Alccayhuaman, K.A.; Botticelli, D. Influence of the position of the antrostomy in sinus floor elevation assessed with cone-beam computed tomography: A randomized clinical trial. *J. Investig. Clin. Dent.* 2018, 9, e12362.
10. Kawakami, S.; Lang, N.P.; Ferri, M.; Apaza Alccayhuaman, K.A.; Botticelli, D. Influence of the height of the antrostomy in sinus floor elevation assessed by cone beam computed tomography—A randomized clinical trial. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* 2019, 34, 223–232.
11. Caneva, M.; Lang, N.P.; Garcia Rangel, I.J.; Ferreira, S.; Caneva, M.; De Santis, E.; Botticelli, D. Sinus mucosa elevation using Bio-Oss® or Gingostat® collagen sponge: An experimental study in rabbits. *Clin. Oral Implant. Res.* 2017, 28, e21–e30.
12. Iida, T.; Carneiro Martins Neto, E.; Botticelli, D.; Apaza Alccayhuaman, K.A.; Lang, N.P.; Xavier, S.P. Influence of a collagen membrane positioned adjacent the sinus mucosa following the elevation of the maxillary sinus. A histomorphometric study in rabbits. *Clin. Oral Implant. Res.* 2017, 28, 1567–1576.

13. Omori, Y.; Ricardo Silva, E.; Botticelli, D.; Apaza Alccayhuaman, K.A.; Lang, N.P.; Xavier, S.P. Reposition of the bone plate over the antrostomy in maxillary sinus augmentation: A histomorphometric study in rabbits. *Clin. Oral Implant. Res.* 2018, 29, 821–834.
14. Masuda, K.; Silva, E.R.; Botticelli, D.; Apaza Alccayhuaman, K.A.; Xavier, S.P. Antrostomy preparation for maxillary sinus floor augmentation using drills or a sonic instrument: A microcomputed tomography and histomorphometric study in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* 2019, 34, 819–827.
15. Lee, J.S.; Shin, H.K.; Yun, J.H.; Cho, K.S. Randomized Clinical Trial of Maxillary Sinus Grafting using Deproteinized Porcine and Bovine Bone Mineral. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* 2017, 19, 140–150.
16. De Molon, R.S.; Magalhaes-Tunes, F.S.; Semedo, C.V.; Furlan, R.G.; de Souza, L.G.L.; de Souza Faloni, A.P.; Marcantonio, E., Jr.; Faeda, R.S. A randomized clinical trial evaluating maxillary sinus augmentation with different particle sizes of demineralized bovine bone mineral: Histological and immunohistochemical analysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2019, 48, 810–823.
17. Jensen, S.S.; Aaboe, M.; Janner, S.F.; Saulacic, N.; Bornstein, M.M.; Bosshardt, D.D.; Buser, D. Influence of particle size of deproteinized bovine bone mineral on new bone formation and implant stability after simultaneous sinus floor elevation: A histomorphometric study in minipigs. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* 2015, 17, 274–285.
18. De Santis, E.; Lang, N.P.; Ferreira, S.; Rangel Garcia, I., Jr.; Caneva, M.; Botticelli, D. Healing at implants installed concurrently to maxillary sinus floor elevation with Bio-Oss® or autologous bone grafts. A histo-morphometric study in rabbits. *Clin. Oral Implant. Res.* 2017, 28, 503–511.
19. Masuda, K.; Silva, E.R.; Apaza Alccayhuaman, K.A.; Botticelli, D.; Xavier, S.P. Histologic and micro-ct analyses at implants placed immediately after maxillary sinus elevation using large or small xenograft granules: An experimental study in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* 2020, 35, 739–748.
20. Hoang, T.N.; Mealey, B.L. Histologic comparison of healing after ridge preservation using human demineralized bone matrix putty with one versus two different-sized bone particles. *J. Periodontol.* 2012, 83, 174–181.
21. Dos Anjos, T.L.; de Molon, R.S.; Paim, P.R.; Marcantonio, E.; Marcantonio, E., Jr.; Faeda, R.S. Implant stability after sinus floor augmentation with deproteinized bovine bone mineral particles of different sizes: A prospective, randomized and controlled split-mouth clinical trial. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2016, 45, 1556–1563.
22. Chackartchi, T.; Iezzi, G.; Goldstein, M.; Klinger, A.; Soskolne, A.; Piattelli, A.; Shapira, L. Sinus floor augmentation using large (1–2 mm) or small (0.25–1 mm) bovine bone mineral particles: A prospective, intra-individual controlled clinical, microcomputerized tomography and histomorphometric study. *Clin. Oral Implant. Res.* 2011, 22, 473–480.
23. Schroeder, H.E.; Münzel-Pedrazzoli, S. Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue. Morphometric model, tissue sampling and test of stereologic procedures. *J. Microsc.* 1973, 99, 301–329.
24. Botticelli, D.; Lang, N.P. Dynamics of osseointegration in various human and animal models—A comparative analysis. *Clin. Oral Implant. Res.* 2017, 28, 742–748.

25. Iida, T.; Baba, S.; Botticelli, D.; Masuda, K.; Xavier, S.P. Comparison of histomorphometry and microCT after sinus augmentation using xenografts of different particle sizes in rabbits. *Oral Maxillofac. Surg.* 2020, 24, 57–64.
26. Busenlechner, D.; Huber, C.D.; Vasak, C.; Dobsak, A.; Gruber, R.; Watzek, G. Sinus augmentation analysis revised: The gradient of graft consolidation. *Clin. Oral Implant. Res.* 2009, 20, 1078–1083.
27. Aimetti, M.; Massei, G.; Morra, M.; Cardesi, E.; Romano, F. Correlation between gingival phenotype and Schneiderian membrane thickness. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* 2008, 23, 1128–1132.
28. Janner, S.F.; Caversaccio, M.D.; Dubach, P.; Sendi, P.; Buser, D.; Bornstein, M.M. Characteristics and dimensions of the Schneiderian membrane: A radiographic analysis using cone beam computed tomography in patients referred for dental implant surgery in the posterior maxilla. *Clin. Oral Implant. Res.* 2011, 22, 1446–1453.
29. Scharf, K.E.; Lawson, W.; Shapiro, J.M.; Gannon, P.J. Pressure measurements in the normal and occluded rabbit maxillary sinus. *Laryngoscope* 1995, 105, 570–574.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 088/2017

Ribeirão Preto, 14 de junho de 2017.

Ref. processo nº 2017.1.278.58.9

Senhor Pesquisador,

Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais da FORP, em sua 49ª Sessão Ordinária, realizada em 14 de junho de 2017, **aprovou** os procedimentos éticos apresentados no Protocolo sobre a Pesquisa intitulada: "Reparo de seios maxilares enxertados com osso mineral bovino de diferentes granulações e influência do deslocamento da janela óssea. Estudo histomorfométrico em coelhos", emitindo o certificado anexo.

Informamos, também, que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, **até 13/07/2018**, o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Anđiara De Rossi Daldegan
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Samuel Porfírio Xavier

Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia
desta Faculdade

./aafn

025092-88 20/06/2017 14:03



Article

Osteoconductivity of Bovine Xenograft Granules of Different Sizes in Sinus Lift: A Histomorphometric Study in Rabbits

Eduardo Pires Godoy¹, Karol Alí Apaza Alccayhuaman² , Daniele Botticelli³ , Andrea Amaroli^{4,*} , Vitor Ferreira Balan⁵, Erick Ricardo Silva⁵ and Samuel Porfirio Xavier⁵

¹ Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo 14040-904, Brazil; eduardo.godoy@usp.br

² Department of Oral Biology, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria; caroline7_k@hotmail.com

³ ARDEC Academy, 47923 Rimini, Italy; daniele.botticelli@gmail.com

⁴ Department of Orthopaedic Dentistry, Faculty of Dentistry, First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991 Moscow, Russia

⁵ Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology, Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo 14040-904, Brazil; vitor.balan@usp.br (V.F.B.); erickricardo.rp@gmail.com (E.R.S.); spx@forp.usp.br (S.P.X.)

* Correspondence: andrea.amaroli.71@gmail.com

Abstract: Background: Due to the lack of data on bone-to-graft contact (BGC) over time in the various regions within the subantral space of the augmented sinus floor, the present study aimed to evaluate the osteoconductivity of deproteinized bovine bone mineral (DBBM) with granules of different sizes applied in maxillary sinus floor elevation. Methods: A maxillary sinus augmentation was performed bilaterally in 18 rabbits using DBBM with particle dimensions of either 0.125–1.0 mm or 1–2 mm. The antrostomy was covered using a collagen barrier. The animals were euthanized in groups of six after 2, 4, and 8 weeks of healing. MicroCT and histological analyses were performed. Results: After 2 weeks of healing, BGC was 10.9% and 11.9% for the small and large granule sites, respectively. After 8 weeks of healing, the BGC increased to 65% and 62% at the small and large granule sites, respectively. The highest values were located close to the bony walls and the bony window. New bone content developed between 2 and 8 weeks from 7.0% to 27.6% and from 6.1% to 27.6% at the small and large granule sites, respectively. Conclusions: Similar outcomes in osteoconductivity and bone formation were found at both small and large DBBM granule sites.

Keywords: animal study; sinus floor elevation; bone healing; osteoconductivity; histology; morphometry; collagen membrane; xenograft



Citation: Godoy, E.P.; Alccayhuaman, K.A.A.; Botticelli, D.; Amaroli, A.; Balan, V.F.; Silva, E.R.; Xavier, S.P. Osteoconductivity of Bovine Xenograft Granules of Different Sizes in Sinus Lift: A Histomorphometric Study in Rabbits. *Dent. J.* **2021**, *9*, 61. <https://doi.org/10.3390/dj9060061>

Academic Editor: Patrick R. Schmidlin

Received: 28 April 2021

Accepted: 27 May 2021

Published: 31 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

When the bone volume in the posterior regions of the maxilla does not allow the installation of implants of adequate length, a sinus floor augmentation procedure is often applied to increase the height of available bone. Due to the tendency of the sinuses to re-pneumatize over time after the elevation of the Schneiderian membrane [1–5], various biomaterials have been applied, aiming to counteract that re-pneumatization [6].

Xenografts of various particle sizes are widely used as filler materials [7–10]. Depending on their structure, the particles of xenografts will either be resorbed over time at different rates or embedded into newly formed tissues [11–14]. Deproteinized bovine bone mineral (DBBM) has been applied in several clinical [7,8,15,16] and experimental studies [11,17–19], showing high volumetric stability compared with other biomaterials.

The influence of the size of the particles on the clinical outcomes has also been evaluated.

In a randomized clinical study [20], a ridge preservation technique was applied after molar extraction. Human demineralized bone matrix putty was used as a filler. The putty either contained particles of small size (0.125–0.710 mm) or a mixture of larger dimension

(2–4 mm) and small particles. No clinical or histological statistically significant differences were found between the two augmentation sites.

In a randomized controlled split-mouth clinical study [16,21], 10 partially edentulous patients were recruited for a bilateral sinus floor augmentation. Granules of different sizes (0.125–1.0 mm or 1–2 mm) of DBBM were used to fill the elevated space in the sinus. After 8 months of healing, 25 implants were installed, and biopsies were retrieved for histological analysis. No statistically significant differences were found either in terms of implant stability, measured after a further 6 months of healing, or regarding residual biomaterial and newly formed bone proportions.

These results are in agreement with the outcomes of other clinical [22] and animal [17] studies on sinus floor augmentation. However, a further clinical study [8] reported larger amounts of new bone formation, compared with small particle size sites.

The integration of DBBM particles (bone-to-graft contact; BGC) has also been evaluated in augmented sinuses [11,17]. In a study in minipigs [17], only the total BGC was evaluated, without providing data divided for each region. In a study in rabbits [11], BGC in various regions of the augmented sites was evaluated after different periods of healing. However, only sites with small granules of DBBM were evaluated.

Due to the uncertainty in the selection of the dimensions of the xenograft to be used and the lack of information about the osteoconductivity of large granules studied at different sites of the augmented sinus, the study of the influence of dimensions of xenograft particles on healing outcomes appears to be justified.

Hence, the present experimental study aimed to evaluate the osteoconductivity of deproteinized bovine bone mineral with granules of different sizes applied in maxillary sinus floor augmentation.

The null hypothesis was that of no difference in osteoconductivity or bone formation at the sites augmented with either small or large granules of deproteinized bovine bone mineral (DBBM).

2. Materials and Methods

The experimental protocol was submitted and approved by the Ethical Committee of the Faculty of Dentistry in Ribeirão Preto of the University of São Paulo on 14 June 2017 (USP, SP-Brazil; 2017.1.278.58.9). The study is reported according to the ARRIVE guidelines. The guidelines for animal care adopted in Brazil were strictly followed.

2.1. Animal Sample

Eighteen New Zealand white rabbits, approximately 3.5–4.0 kg and 4–5 months of age, were used. Three groups of six animals each were randomly assigned to a different period of healing, i.e., 2, 4, and 8 weeks, respectively.

To adhere to the Three R requirements for animal research, a rabbit model was selected owing to the simplicity of the surgical treatment. Moreover, the use of a split-mouth design reduced the variability among animals, a fact that decreased the number of animals needed. Nevertheless, for sample calculation, data from an experiment in minipigs [17] were used. In that experiment, a difference of 9.1% in BGC was found after 6 weeks of healing in favor of small compared with large granule sites. With a standard deviation of 6%, six rabbits were calculated to be sufficient to reject the null hypothesis with a power of 0.8 and an $\alpha = 0.05$.

2.2. Randomization and Allocation Concealment

The randomization for the placement of xenograft granules of different dimensions was performed digitally (www.randomization.com, accessed on 1 July 2017) by one author not involved in the surgeries (DB). Blinding was not possible due to the visible differences between the two biomaterials, neither for the surgeon nor for the histological assessor. To limit the inclusion of biases, the surgeon (ERS) was informed about the side (right or

left) on which to place the xenografts after the elevation of both sinuses. Moreover, no indications were reported on the histological slides regarding test and control sites.

2.3. Surgical Procedures

A maxillofacial surgeon specialist (ERS) performed all surgeries. The anesthesia was induced using acepromazine (1.0 mg/kg; Acepran[®], Vetnil, Louveira, São Paulo, Brazil), administrated subcutaneously, and a mix of xylazine (3.0 mg/kg; Dopaser[®], Hertape Calier, Juatuba, Minas Gerais, Brazil) and 50 mg/kg ketamine hydrochloride (Ketamin Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brazil) injected i.m. Local anesthesia was added in the experimental regions.

After having shaved and disinfected the experimental area, an incision ~2.5 cm long was carried out along the midline of the nasal dorsum. Skin, muscles, and periosteum were elevated, and the nasal bone was exposed bilaterally at the nasal-incisal suture. A squared antrostomy, of about 4 mm in dimensions, was prepared with diamond drills on both sides, laterally to the nasal-incisal suture, and anteriorly to the nasal-frontal suture (Figure 1A). The sinus mucosa was detached from the bony walls and elevated at both sides. A small screw was placed in the nasal-incisal suture as a landmark for the histological processing to identify the central position of the antrostomies. Deproteinized bovine bone mineral (DBBM) granules (Bio-Oss[®], Geistlich Biomaterials, Wolhusen, LU, Switzerland), either 0.250–1.0 mm or 1.0–2.0 mm, were randomly allocated and grafted within the elevated space in similar volumes (Figure 1B). The antrostomies were subsequently covered with collagen barriers (Bio-Gide[®] Geistlich Biomaterials, Wolhusen, LU, Switzerland) (Figure 1C).



Figure 1. View of the clinical procedures in the experimental region. (A) A 3.5–4 mm antrostomy was prepared on both sides, laterally to the nasal-incisal suture, and anteriorly to the nasal-frontal suture. (B) Deproteinized bovine bone mineral granules either 0.250–1.0 mm or 1.0–2.0 mm were randomly allocated and grafted within the elevated space in similar quantity. (C) The antrostomies were subsequently covered with collagen barriers.

Resorbable sutures were used for the periosteum (Polyglactin 910 5-0, Vicryl[®], Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brazil) while nylon sutures were used to close the skin flaps (Ethilon 4-0[®], Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brazil).

2.4. Maintenance Care and Euthanasia

Each animal was kept in an individual cage and within an acclimatized room. The wounds and the biological functions were carefully monitored by veterinarians during the full period of the experiment. The animals had access to food and water ad libitum.

The same procedures used to induce anesthesia during surgery were also applied for euthanasia. An overdose of sodium thiopental (1.0 g, 2 mL; Thiopentax[®], Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, Itapira, São Paulo, Brazil) was added to euthanize the animals. Biopsies were retrieved in blocks and were fixed in 10% buffered formalin.

2.5. MicroCT Evaluations

A microCT analysis was performed using a microCT 1172 equipment (Bruker, Kontich, Belgium). The parameters were as follows: 9.92 μm isotropic pixel, 60 KV/165 μA , filter Al 0.5 mm, exposure time 596 ms, rotation step 0.4 degrees, frame average 4, and

random movement 10. The software DataViewer[®] (Bruker, Kontich, Belgium) was used to reposition the cross-sectional images, and measurements were performed with the software CTan (Bruker, Kontich, Belgium). All evaluations were performed by a calibrated author (KAAA).

2.6. Histological Preparation

The experimental region was reduced, and the biopsies were dehydrated in increasing concentrations of ethanol. Subsequently, the biopsies were infiltrated in resin (LR White[™] hard grid, London Resin Co Ltd., Berkshire, UK). After polymerization, two ground sections were prepared using the small screw as a reference and following a transverse plane.

The ground sections were first prepared at a width of about 100–150 μm using a precision slicing equipment (Exakt[®], Apparatebau, Norderstedt, Germany), and then they were ground to about 50–60 μm using a cutting–grinding machine (Exakt[®], Apparatebau, Norderstedt, Germany). The sections were stained with either toluidine blue or Stevenel's blue and alizarin red.

2.7. Calibration for Histomorphometric Evaluations

All histological measurements were made by a trained assessor (KAAA) after a calibration with another professional (DB) performed until the inter-rater agreement in the recognition of the tissues reached $K > 0.90$.

2.8. Histomorphometric Evaluations

The histological measurements were carried out using the software NIS-Elements D (v 4.0, Laboratory Imaging, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) on an Eclipse Ci microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) equipped with a video camera (Digital Sight DS-2Mv, Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

The area of the augmented space was evaluated in all three periods of healing while the residual defects on the antrostomy were measured at 8 weeks of healing.

The following regions within the augmented space were analyzed (Figure 2): (i) close to the medial and lateral bony walls (bone wall regions), (ii) in the center of the elevated space (middle region), (iii) subjacent to the sinus mucosa (sub-mucosal region), and (iv) in close vicinity to the antrostomy, still within the sinus (close-to-window region). The antrostomy (antrostomy region) was evaluated in three different zones: close to the lateral and medial margins and in the center of the antrostomy.

As linear measurements, the following tissues in contact with the xenograft surface were evaluated for all granules within the evaluated regions at a magnification of $\times 100$: mineralized bone, marrow spaces, dense and loose matrix tissues, osteoclasts, and vessels. Bone-to-implant contact percentage (BGC%) represented the proportion of bone in contact with the xenograft granule surface in relation to the total surface of the xenograft evaluated.

To perform morphometric measurements, a point-counting procedure was used [23]. Lattices with squares of 75 μm in dimensions were superposed onto the image of the histological slide at $\times 100$ magnification. The proportions of the following tissues were included in the analyses: mineralized bone, marrow spaces, dense and loose matrix tissues, connective tissue, xenograft, inflammatory cells, osteoclasts, vessels, and membrane residues.

Moreover, the area of the augmented sinus and the residual defects in the outer part of the antrostomy were measured.

As an explorative aim, the intersection point [24] was evaluated between dense tissue and newly formed bone in contact with the graft surface.



Figure 2. The various regions analyzed in the augmented sinus (BW = bone walls; M = middle; SM = sub-mucosa; CtW = close-to-window) and the antrostomy region (AL = lateral; AM = medial margin; AC = center of the antrostomy).

2.9. Data Analysis

A report on the comparison of the merged data of both granule sizes regarding only the proportions of new bone and DBBM granule residues in histological and microCT analyses has been already published [25]. In the present study, the primary outcome variable was the osteoconductivity as expressed by BGC% as total data and for the single regions evaluated. The content in percentages of new bone, of DBBM and the other tissues, is reported separately for small and large granules. For the microCT analysis, only the volumetric changes over time are reported.

The total mineralized bone was used as a secondary variable. Mean values and standard deviations are reported for each outcome. Mean values were obtained for the two histological slides. All calculations were carried out using the software Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Statistical analyses were performed for both primary and secondary variables using the IBM SPSS Statistics software (IBM Inc., Chicago, IL, USA). The Wilcoxon test was used to evaluate differences between large and small particle sizes. The level of significance was set at 5%.

3. Results

No perforations of the mucosa were noticed during the surgical procedures. All biopsies were collected and histologically processed, and an $n = 6$ was achieved for each period of healing.

The volumes evaluated in the microCT (Figure 3A–C) were about 132, 114, and 115 mm³ at the sites with large granules, and 123, 104, and 118 mm³ at the sites with small granules after 2, 4, and 8 weeks, respectively. No statistically significant differences were found between large and small granule sites for any of the three healing periods analyzed.

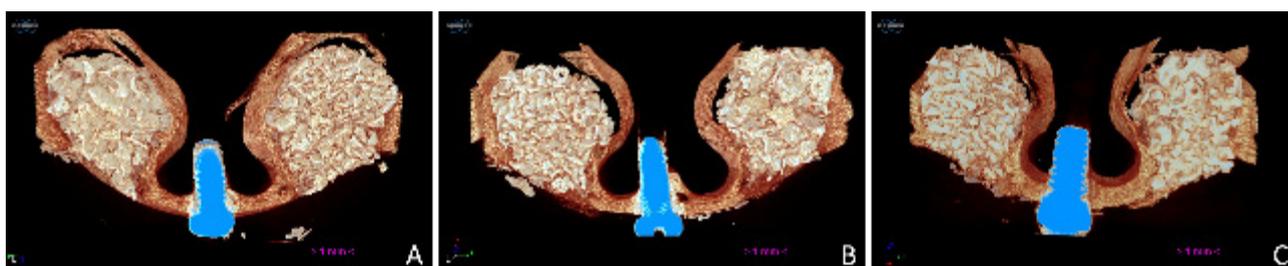


Figure 3. MicroCT 3D images representing the augmented sinus at the 0.125–1 mm and 1–2 mm size granules after 2 (A), 4 (B), and 8 (C) weeks of healing.

The histological analyses (Figure 4A–C) showed that the augmented area slightly decreased over time in both augmentation sites, by 17.5 ± 3.8 , 16.5 ± 2.0 , and 14.6 ± 1.0 mm² at the small particle sites, and by 17.1 ± 2.3 , 16.6 ± 2.5 , and 15.3 ± 3.1 mm² at the large particle sites, after 2, 4, and 8 weeks, respectively. No statistically significant differences were found between sites or between healing periods. Small residual defects in the outer part of the antrostomy were present after 8 weeks of healing in both the small (0.3 ± 0.2 mm²) and the large (0.4 ± 0.3 mm²) particle sites. No statistically significant differences were found between sites either.



Figure 4. Ground sections representing the augmented sinus at the 0.125–1 mm and 1–2 mm size granules after 2 (A), 4 (B), and 8 (C) weeks of healing. Images originally taken with objective $\times 10$. Stevenel's blue and alizarin red stain.

After 2 weeks of healing (Figure 5A,B), in the histological analyses of the content of the augmented sinuses (Table 1), bone was found at percentages of $7.0 \pm 4.5\%$ in the small granule sites and $6.3 \pm 3.4\%$ in the large granule sites ($p = 0.686$). Xenograft was occupying about 50% of the area in both sites ($p = 0.753$). Dense matrix tissue was found at about 20% in both sites ($p = 0.917$) surrounding the xenograft granules, while loose matrix tissue was interposed among the granules. New bone was found growing within the granules and in close contact with the xenograft surfaces (Table 2). The percentages of tissues in contact with the xenograft were mainly represented by dense tissue ($\sim 70\%$), while the newly formed bone was covering 11–12% ($p = 0.753$) of the surfaces. Bone was found at higher percentages in the bone wall regions (Table 3). Osteoclasts were found at percentages of $\sim 5\%$ ($p = 0.462$).

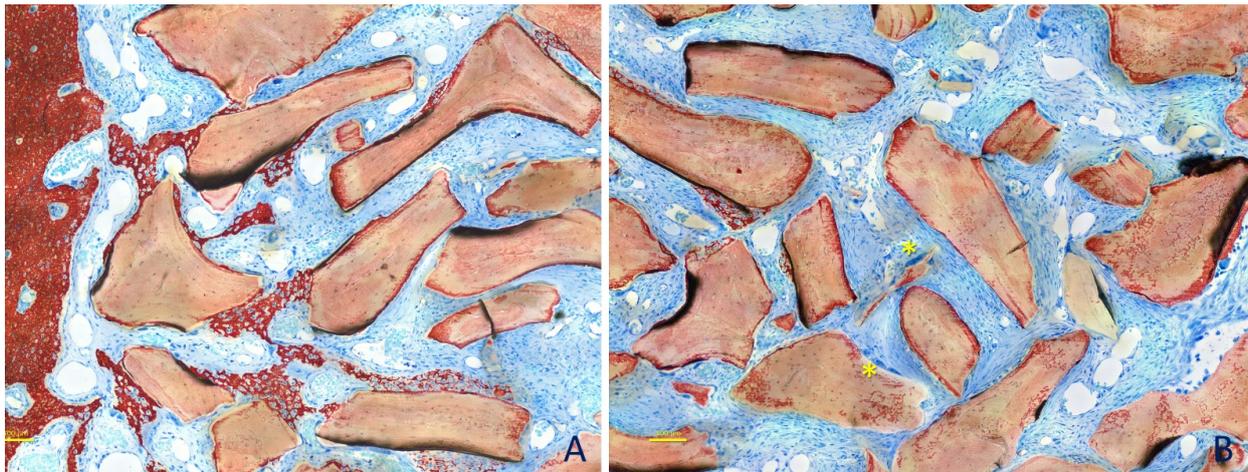


Figure 5. Photomicrographs of ground sections representing the healing after 2 weeks at small granules sites. (A) Newly formed bone was found close to the bone walls and lining on the surface of the DBBM. (B) A dense tissue rich in fibroblast-like cell was seen surrounding the DBBM particles. A loose tissue rich in vessels was interposed among particles. Some multicellular cells were visible (e.g., *). Original magnification $\times 200$. Stevenel's blue and alizarin red stain.

Table 1. Tissue components within the augmented sinuses in the three periods of evaluation. Mean values (in bold) \pm standard deviations; median in percentages.

		New Bone	Marrow Spaces	DBBM	Dense Tissue	Loose Tissue	Vessels	Other Tissues
2 weeks	Small granules	7.0 \pm 4.5; 6.6	2.4 \pm 2.9; 1.8	50.6 \pm 6.4; 51.5	20.2 \pm 3.6; 20.1	12.9 \pm 5.2; 12.8	2.9 \pm 2.1; 2.6	4.0 * \pm 7.1; 1.2
	Large granules	6.3 \pm 3.4; 5.4	3.2 \pm 1.8; 2.7	52.6 \pm 7.9; 52.4	20.3 \pm 2.5; 19.7	14.6 \pm 4.9; 15.9	2.6 \pm 2.1; 2.1	0.4 * \pm 0.2; 0.3
4 weeks	Small granules	16.7 \pm 3.4; 16.9	11.3 \pm 9.8; 8.3	48.5 \pm 4.7; 47.5	12.8 \pm 7.8; 12.2	6.4 \pm 3.6; 6.7	3.8 \pm 1.4; 4.0	0.3 \pm 0.4; 0.2
	Large granules	18.4 \pm 6.0; 18.4	11.1 \pm 7.4; 9.5	43.5 \pm 3.2; 42.1	12.9 \pm 5.7; 11.6	8.3 \pm 2.3; 8.3	5.4 \pm 2.2; 4.4	0.3 \pm 0.3; 0.2
8 weeks	Small granules	27.6 \pm 4.6; 27.2	16.4 \pm 5.0; 16.3	46.3 \pm 3.4; 46.1	6.3 \pm 4.4; 5.7	2.5 \pm 2.0; 2.6	0.7 \pm 0.5; 0.5	0.1 \pm 0.3; 0.0
	Large granules	27.6 \pm 4.8; 27.0	19.2 \pm 3.8; 18.6	44.3 \pm 5.0; 43.8	4.2 \pm 3.4; 5.1	3.1 \pm 4.0; 1.2	1.3 \pm 0.7; 1.3	0.3 \pm 0.5; 0.0

* $p < 0.05$ between test and control sites.

Table 2. Tissues in contact with the DBBM surface in the three periods of evaluation. Mean values (in bold) \pm standard deviations; median in percentages.

		New Bone	Marrow Spaces	Dense Tissue	Loose Tissue	Vessels	Osteoclasts
2 weeks	Small granules	10.9 \pm 6.3; 12.5	1.0 \pm 1.1; 0.9	70.9 \pm 9.1; 73.3	12.6 \pm 5.5; 14.1	0.1 \pm 0.2; 0.0	4.6 \pm 3.7; 3.5
	Large granules	11.9 \pm 5.9; 11.5	1.5 \pm 0.9; 1.7	69.6 \pm 7.4; 71.4	11.5 \pm 5.1; 11.4	0.3 \pm 0.5; 0.0	5.1 \pm 3.4; 3.9
4 weeks	Small granules	48.6 \pm 13.1; 46.3	11.7 \pm 10.4; 8.3	35.0 \pm 16.2; 34.4	2.6 \pm 2.2; 2.1	0.0 \pm 0.0; 0.0	2.2 \pm 2.1; 1.6
	Large granules	49.1 \pm 18.2; 48.3	10.8 \pm 9.1; 8.5	35.5 \pm 19.7; 32.7	2.2 \pm 2.2; 1.6	0.0 \pm 0.0; 0.0	2.4 \pm 2.3; 1.9
8 weeks	Small granules	65.0 \pm 7.3; 65.9	16.9 \pm 3.7; 17.7	15.0 \pm 8.1; 13.8	2.2 \pm 2.1; 1.9	0.0 \pm 0.0; 0.0	0.9 \pm 0.6; 0.9
	Large granules	62.0 \pm 8.7; 61.8	15.6 \pm 5.8; 15.0	21.0 \pm 10.0; 18.3	0.5 \pm 0.6; 0.3	0.0 \pm 0.0; 0.0	0.9 \pm 0.6; 0.8

$p < 0.05$ between test and control sites.

Table 3. BGC in the various regions evaluated within the augmented sinus in the three periods of evaluation. Mean values (in bold) \pm standard deviations; median in percentages.

	Small Granules			Large Granules		
	2 Weeks	4 Weeks	8 Weeks	2 Weeks	4 Weeks	8 Weeks
Bone walls	23.6 \pm 14.2; 29.6	67.0 \pm 8.2; 69.8	73.4 \pm 6.2; 73.2	20.1 \pm 7.7; 17.4	63.2 \pm 19.2; 67.7	67.1 \pm 8.1; 67.2
Schneiderian	6.2 \pm 13.8; 0.0	25.1 \pm 22.1; 25.4	40.8 \pm 18.1; 45.0	9.5 \pm 12.7; 4.3	31.7 \pm 22.3; 32.9	54.5 \pm 24.9; 57.6
Middle zone	2.4 \pm 5.4; 0.0	42.9 \pm 23.1; 39.6	64.0 \pm 20.6; 70.0	11.9 \pm 15.6; 4.8	29.6 \pm 23.9; 24.1	49.1 \pm 22.0; 53.1
Close window	3.1 \pm 4.8; 0.0	47.2 \pm 15.3; 52.8	74.8 \pm 4.6; 76.9	0.0 \pm 0.0; 0.0	52.0 \pm 24.4; 60.4	71.9 \pm 8.7; 74.5
Full area	10.9 \pm 6.3; 12.5	48.6 \pm 13.1; 46.3	65.0 \pm 3.7; 65.9	11.9 \pm 5.9; 11.5	49.1 \pm 18.2; 48.3	62.0 \pm 8.7; 61.8

$p < 0.05$ between test and control sites.

After 4 weeks of healing (Table 1; Figure 6A,B), newly formed bone was occupying 17–18% ($p = 0.173$) of the areas analyzed, and xenograft was still occupying ~44–49% of this area ($p = 0.116$). The dense tissue proportions decreased to ~13% ($p = 0.917$). The tissues in contact with the xenograft surfaces (Table 2) were now mainly represented by newly formed bone (~49%; $p = 0.753$) while the dense tissue proportions were reduced to ~35–36% ($p = 0.674$). Osteoclast proportions also decreased to ~2% ($p = 0.395$).

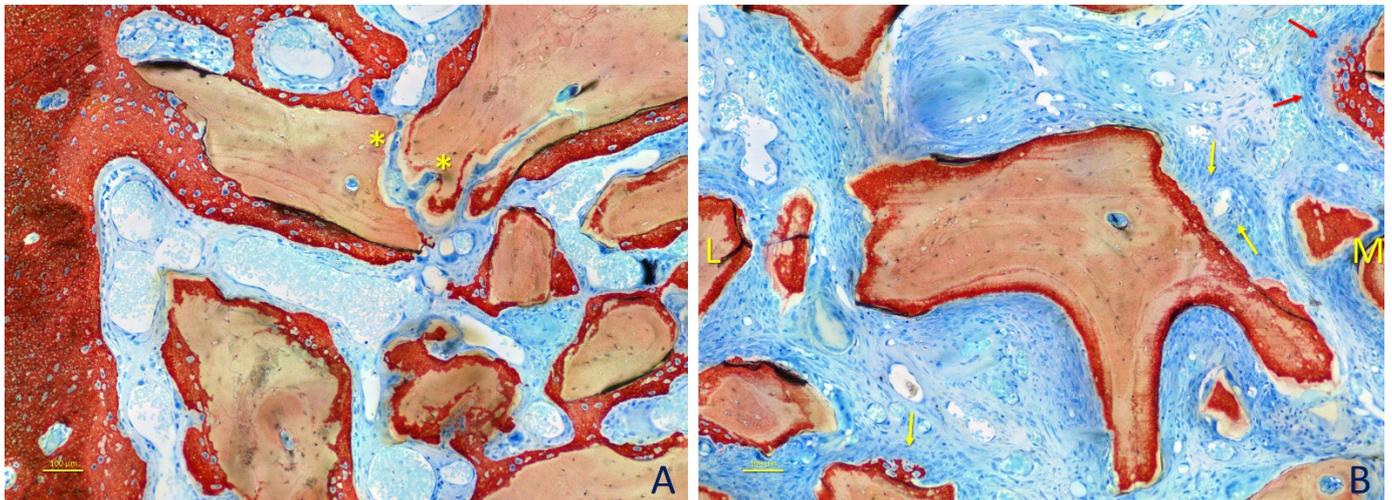


Figure 6. Photomicrographs of ground sections representing the healing after 4 weeks at large granules sites. (A) Bone walls region. Higher content of new bone was found compared with the previous period analyzed. Some multicellular cells were still visible (e.g., *). (B) New bone reached over time the most central regions, growing from the lateral (L) and mesial (M) bone walls of the sinus. The granule in the center presents a higher peripheral chromaticity compared with that seen in the previous period of healing. Moreover, some of the dense tissue surrounding the granule appeared to have a higher content of active cells, especially in zones where the new bone was formed between the graft surface and the cellular cluster (yellow arrows). Note a front of new bone formation and osteoid tissue (red arrows). Original magnification $\times 200$. Stevenel's blue and alizarin red stain.

After 8 weeks of healing (Table 1; Figure 7A,B), the new bone within the augmented area further increased to ~28% ($p = 0.753$) in both the small and large granule sites, while the dense tissue was reduced to 4–6% ($p = 0.173$). The percentages of xenograft were similar to those of the previous periods of healing. New bone in contact with the xenograft (Table 2) was coating $65 \pm 7.3\%$ of the surface at the small granule sites and $62 \pm 8.7\%$ at the large granule sites ($p = 0.345$). The corresponding percentages of dense tissue were $15.0 \pm 8.1\%$ and $21.0 \pm 10\%$ at the small and large granule sites, respectively. Osteoclasts were found at percentages $< 1\%$.

In both granule augmentation sites, the intersection point between new bone and dense tissue (Table 4) occurred earlier in the bony wall region and later in the Schneiderian membrane region (Figure 8).

Table 4. Intersection points between newly formed bone and dense tissue. Days (in bold) and percentage of BGC are reported.

	Bone Walls	Schneiderian	Middle Zone	Close Window	Full Area
Small granules	19.5 ; 40.6%	55.9 ; 40.8%	28.6 ; 44.5%	26.1 ; 41.1%	25.4 ; 41.6%
Large granules	20.8 ; 41.2%	43.2 ; 44.0%	47.3 ; 43.0%	24.6 ; 39.5%	25.3 ; 42.0%

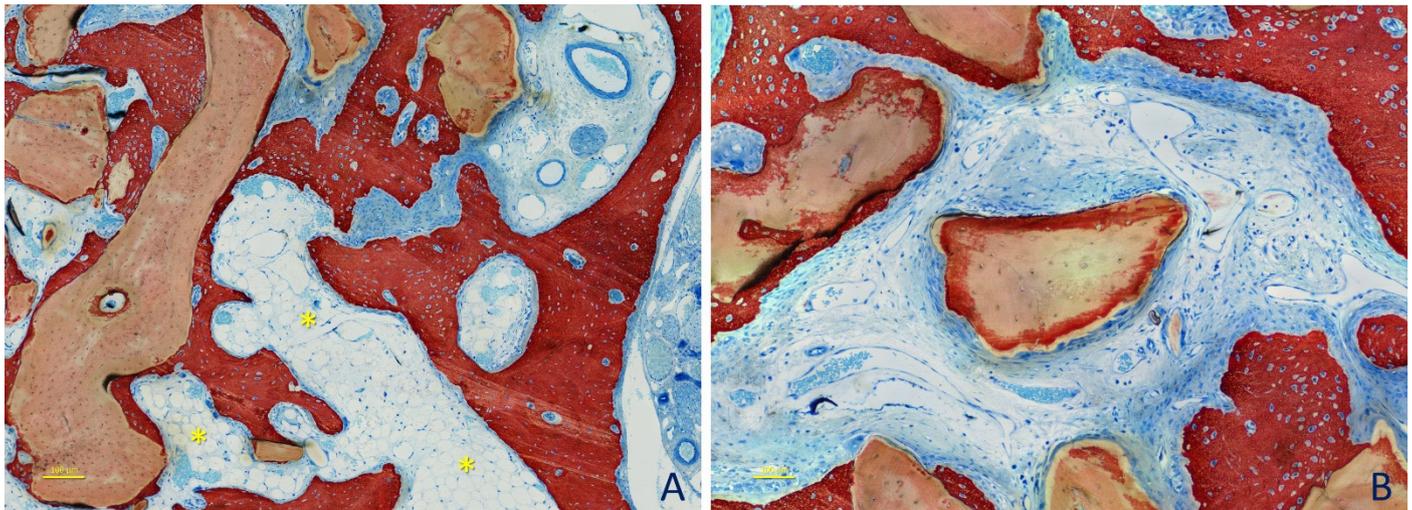


Figure 7. Photomicrographs of ground sections representing the healing after 8 weeks at small granule sites. (A) Marrow spaces were seen at this stage of healing (yellow asterisks). (B) A particle with augmented chromaticity, not yet reached by newly formed bone. Original magnification $\times 200$. Stevenel's blue and alizarin red stain.

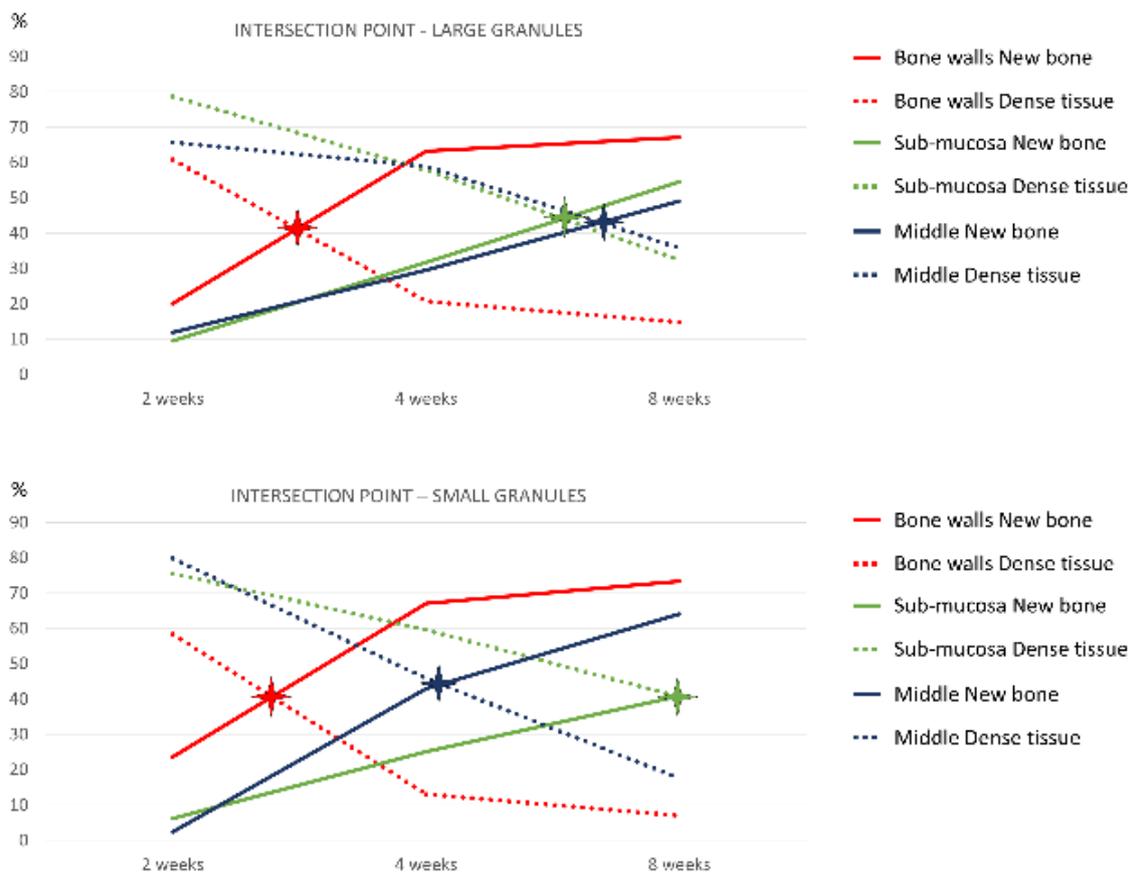


Figure 8. Graphs representing the percentages of BGC and dense tissue in contact with the graft surface in the various regions and periods evaluated. Stars indicate the intersection point between new bone and dense tissue.

4. Discussion

The present experiment aimed to evaluate the osteoconductivity of deproteinized bovine bone mineral (DBBM) with granules of different sizes used for maxillary sinus

floor augmentation. As a secondary aim, bone formation within the augmented sites was evaluated. No differences were found in terms of new bone formation or BGC.

The novelty of the present study was the sequential evaluation of BGC in various regions within the sinus for both small and large granules. Moreover, various tissues not analyzed in other studies that compared small and large granules were taken into consideration both within the elevated sinuses and in contact with the graft granules.

After 2 weeks of healing, the tissues in contact with the DBBM surfaces were represented mainly by dense tissue, which was surrounding up to about 70% of the surfaces of both grafts, while new bone represented 11–12%. The highest amounts of BGC were seen close to the bony walls (20–24%) in both augmentation sites. This is in agreement with an experimental study in minipigs [26], which showed a gradient of higher graft incorporation in the region close to the bone walls.

In the present study, the new bone in contact with the xenograft increased during the following periods of healing reaching fractions of 62–65% after 8 weeks, while the dense tissues were reduced correspondingly. These outcomes are in agreement with those of another study in rabbits in which small DBBM granules or a collagen sponge were used to augment the sinus floor in rabbits. In that study, healing was evaluated after 7, 14, 21, and 40 days [11]. After 40 days of healing, 68.1% of BGC was found. It was also shown that the highest bone contact to the DBBM granules in the early phases of healing was located close to the bony walls. Moreover, when the data representing the percentage of total bone (mineralized bone and marrow spaces) and that of the soft tissues (dense and loose tissues) were illustrated in a graph, the lines representing the percentages in the various periods analyzed were intercepting each other at different periods. The earliest intersection occurred in the regions close to the bony walls followed by the middle and the sub-mucosal regions. This may be interpreted as if bone formation on the DBBM surfaces started from the bony walls and then proceeded towards the other regions owing to the osteoconductive properties of the biomaterial. In the present study, similar graphs were also prepared, however, using only the data of new bone and dense tissues. At the small granule sites, analogous outcomes to the previous study [11] were observed. However, for the large granule sites, a delayed intersection point for the middle region was found compared with the small granule sites, so that the intersection point was similar to that observed in the sub-mucosa region. This, in turn, may indicate a higher osteoconductivity of small versus large DBBM particles in the central portion of the grafted region. Nevertheless, the total amount of BGC in all regions was similar. These findings are not in agreement with those of a study in minipigs [17] in which large or small DBBM particles, similar to those applied in the present experiment, were used for maxillary sinus floor augmentation. Implants were immediately installed, and the animals were euthanized after 6 or 12 weeks. The full augmented area was analyzed, and a higher proportion of BGC was observed at the small granule compared with the large granule sites in the early phases of healing.

In the present study, within the augmented area, the pattern of healing of the various tissues examined at the various periods of healing was similar in both augmentation sites. New bone increased in both sites from 6–7% to about 28% between 2 and 8 weeks of healing. During the same period of observation, the graft was reduced in percentage from about 51–53% to 44–46%. These findings support those reported by other experimental studies, which showed an increased bone formation and a decreased percentage of deproteinized bovine bone mineral (DBBM) graft over time [11,17,18].

Histological evaluation of the healing at the maxillary sinus augmented with either small or large granules of DBBM was performed both in experimental [17] and clinical studies [8,16,22].

In a minipig experiment [17], the fraction of new bone found after 6 weeks was 39.0% for the small granule sites, and 40.0% for the large granule sites. These fractions increased to 44.3% and ~45.1% for the small and large granule sites after 12 weeks, respectively. In turn, the percentages of DBBM decreased from 25.1% to 21.3% for the small granule sites, and from 24.6% to 19.8% for the large granule sites. In agreement with that study,

the results of the present study allow the conclusion that the size of the granules did not influence new bone formation or DBBM degradation in augmented sites.

In a randomized clinical study [22], after 6 to 9 months of healing, the fraction of bone and DBBM was 28.0% and 34.6% at the small granule and 27.1% and 33.7% at the large granule sites, respectively. No differences were found between sites.

In another RCT study [16], 10 patients were recruited for a bilateral sinus floor elevation. After 8 months of healing, the new bone fraction was 36.1% and 23.8% and the DBBM fraction was 32.3% and 38.6%, at the small and large granule sites, respectively. Again, the differences were not statistically significant.

However, in another multicenter RCT [8], different results were obtained for the fraction of new bone. After 6–8 months, biopsies were collected from 11 patients. The small granule sites presented with 18.8% of new bone and 21.7% of DBBM. The large granule sites displayed significantly higher proportions of new bone of 26.8% and 20.0% of DBBM. Obviously, the biopsies retrieved did not represent the entire spectrum of the augmented area. Moreover, the results of the observation period of that study cannot be compared with the results of the present study.

The main limitations of the present study are the use of phylogenetically lower animals than humans, the small sample size for each period of healing analyzed, and the small dimensions of the sinuses compared with those of the xenograft granules. Moreover, the mucosal width is thinner (~0.08 mm) [12] compared with that of humans (~0.45–1 mm in histological examination [27] and ~0.9–3.1 mm in CBCT examination [28]). These limitations suggest that any inference to similar clinical situations in humans should be considered with care. Nevertheless, the rabbit model presents sinus and nasal pressure values similar to humans for absolute pressures and synchronicity with the respiratory cycle [29].

5. Conclusions

In conclusion, the results of the present study show that similar osteoconductive performances and similar proportions of new bone were observed in various regions of the sinus augmented with either small or large xenograft granules. Hence, both small and large granules of DBBM xenografts may be recommended for sinus floor augmentation.

Author Contributions: Conceptualization, E.P.G., K.A.A.A., D.B., A.A., V.F.B., E.R.S. and S.P.X.; methodology, E.P.G., V.F.B. and E.R.S.; validation, E.P.G. and D.B.; formal analysis, E.P.G., K.A.A.A. and S.P.X.; investigation, E.P.G., K.A.A.A., V.F.B. and E.R.S.; data curation, E.P.G. and K.A.A.A.; writing—original draft preparation, E.P.G., K.A.A.A., D.B. and S.P.X.; supervision, A.A. and V.F.B.; funding acquisition, D.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was completely funded by ARDEC Academy, Italy.

Institutional Review Board Statement: The study was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Dentistry in Ribeirão Preto of the University of São Paulo on 14 June 2017 (USP, SP-Brazil; 2017.1.278.58.9).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data are available on reasonable request.

Acknowledgments: We acknowledge the contribution of Sebastião Bianco (Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, SP, Brazil) to histological processing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Asai, S.; Shimizu, Y.; Ooya, K. Maxillary sinus augmentation model in rabbits: Effect of occluded nasal ostium on new bone formation. *Clin. Oral Implant. Res.* **2002**, *13*, 405–409. [[CrossRef](#)]
2. Xu, H.; Shimizu, Y.; Asai, S.; Ooya, K. Grafting of deproteinized bone particles inhibits bone resorption after maxillary sinus floor elevation. *Clin. Oral Implant. Res.* **2004**, *15*, 126–133. [[CrossRef](#)]

3. Xu, H.; Shimizu, Y.; Ooya, K. Histomorphometric study of the stability of newly formed bone after elevation of the floor of the maxillary sinus. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2005**, *43*, 493–499. [[CrossRef](#)]
4. Scala, A.; Botticelli, D.; Rangel, I.G., Jr.; de Oliveira, J.A.; Okamoto, R.; Lang, N.P. Early healing after elevation of the maxillary sinus floor applying a lateral access: A histological study in monkeys. *Clin. Oral Implant. Res.* **2010**, *21*, 1320–1326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Scala, A.; Botticelli, D.; Faeda, R.S.; Garcia Rangel, I., Jr.; de Oliveira, J.A.; Lang, N.P. Lack of influence of the Schneiderian membrane in forming new bone apical to implants simultaneously installed with sinus floor elevation: An experimental study in monkeys. *Clin. Oral Implant. Res.* **2012**, *23*, 175–181. [[CrossRef](#)]
6. Corbella, S.; Taschieri, S.; Weinstein, R.; Del Fabbro, M. Histomorphometric outcomes after lateral sinus floor elevation procedure: A systematic review of the literature and meta-analysis. *Clin. Oral Implant. Res.* **2016**, *27*, 1106–1122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Cordaro, L.; Bosshardt, D.D.; Palattella, P.; Rao, W.; Serino, G.; Chiapasco, M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: Histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin. Oral Implant. Res.* **2008**, *19*, 796–803. [[CrossRef](#)]
8. Testori, T.; Wallace, S.S.; Trisi, P.; Capelli, M.; Zuffetti, F.; Del Fabbro, M. Effect of xenograft (ABBM) particle size on vital bone formation following maxillary sinus augmentation: A multicenter, randomized, controlled, clinical histomorphometric trial. *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* **2013**, *33*, 467–475. [[CrossRef](#)]
9. Kawakami, S.; Lang, N.P.; Iida, T.; Ferri, M.; Apaza Alccayhuaman, K.A.; Botticelli, D. Influence of the position of the antrostomy in sinus floor elevation assessed with cone-beam computed tomography: A randomized clinical trial. *J. Investig. Clin. Dent.* **2018**, *9*, e12362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Kawakami, S.; Lang, N.P.; Ferri, M.; Apaza Alccayhuaman, K.A.; Botticelli, D. Influence of the height of the antrostomy in sinus floor elevation assessed by cone beam computed tomography—A randomized clinical trial. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2019**, *34*, 223–232. [[CrossRef](#)]
11. Caneva, M.; Lang, N.P.; Garcia Rangel, I.J.; Ferreira, S.; Caneva, M.; De Santis, E.; Botticelli, D. Sinus mucosa elevation using Bio-Oss® or Gingostat® collagen sponge: An experimental study in rabbits. *Clin. Oral Implant. Res.* **2017**, *28*, e21–e30. [[CrossRef](#)]
12. Iida, T.; Carneiro Martins Neto, E.; Botticelli, D.; Apaza Alccayhuaman, K.A.; Lang, N.P.; Xavier, S.P. Influence of a collagen membrane positioned subjacent the sinus mucosa following the elevation of the maxillary sinus. A histomorphometric study in rabbits. *Clin. Oral Implant. Res.* **2017**, *28*, 1567–1576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Omori, Y.; Ricardo Silva, E.; Botticelli, D.; Apaza Alccayhuaman, K.A.; Lang, N.P.; Xavier, S.P. Reposition of the bone plate over the antrostomy in maxillary sinus augmentation: A histomorphometric study in rabbits. *Clin. Oral Implant. Res.* **2018**, *29*, 821–834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Masuda, K.; Silva, E.R.; Botticelli, D.; Apaza Alccayhuaman, K.A.; Xavier, S.P. Antrostomy preparation for maxillary sinus floor augmentation using drills or a sonic instrument: A microcomputed tomography and histomorphometric study in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2019**, *34*, 819–827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lee, J.S.; Shin, H.K.; Yun, J.H.; Cho, K.S. Randomized Clinical Trial of Maxillary Sinus Grafting using Deproteinized Porcine and Bovine Bone Mineral. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2017**, *19*, 140–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. De Molon, R.S.; Magalhaes-Tunes, F.S.; Semedo, C.V.; Furlan, R.G.; de Souza, L.G.L.; de Souza Faloni, A.P.; Marcantonio, E., Jr.; Faeda, R.S. A randomized clinical trial evaluating maxillary sinus augmentation with different particle sizes of demineralized bovine bone mineral: Histological and immunohistochemical analysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2019**, *48*, 810–823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Jensen, S.S.; Aaboe, M.; Janner, S.F.; Saulacic, N.; Bornstein, M.M.; Bosshardt, D.D.; Buser, D. Influence of particle size of deproteinized bovine bone mineral on new bone formation and implant stability after simultaneous sinus floor elevation: A histomorphometric study in minipigs. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2015**, *17*, 274–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. De Santis, E.; Lang, N.P.; Ferreira, S.; Rangel Garcia, I., Jr.; Caneva, M.; Botticelli, D. Healing at implants installed concurrently to maxillary sinus floor elevation with Bio-Oss® or autologous bone grafts. A histo-morphometric study in rabbits. *Clin. Oral Implant. Res.* **2017**, *28*, 503–511. [[CrossRef](#)]
19. Masuda, K.; Silva, E.R.; Apaza Alccayhuaman, K.A.; Botticelli, D.; Xavier, S.P. Histologic and micro-ct analyses at implants placed immediately after maxillary sinus elevation using large or small xenograft granules: An experimental study in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2020**, *35*, 739–748. [[CrossRef](#)]
20. Hoang, T.N.; Mealey, B.L. Histologic comparison of healing after ridge preservation using human demineralized bone matrix putty with one versus two different-sized bone particles. *J. Periodontol.* **2012**, *83*, 174–181. [[CrossRef](#)]
21. Dos Anjos, T.L.; de Molon, R.S.; Paim, P.R.; Marcantonio, E.; Marcantonio, E., Jr.; Faeda, R.S. Implant stability after sinus floor augmentation with deproteinized bovine bone mineral particles of different sizes: A prospective, randomized and controlled split-mouth clinical trial. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2016**, *45*, 1556–1563. [[CrossRef](#)]
22. Chackartchi, T.; Iezzi, G.; Goldstein, M.; Klinger, A.; Soskolne, A.; Piattelli, A.; Shapira, L. Sinus floor augmentation using large (1–2 mm) or small (0.25–1 mm) bovine bone mineral particles: A prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. *Clin. Oral Implant. Res.* **2011**, *22*, 473–480. [[CrossRef](#)]
23. Schroeder, H.E.; Münzel-Pedrazzoli, S. Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue. Morphometric model, tissue sampling and test of stereologic procedures. *J. Microsc.* **1973**, *99*, 301–329. [[CrossRef](#)]

24. Botticelli, D.; Lang, N.P. Dynamics of osseointegration in various human and animal models—A comparative analysis. *Clin. Oral Implant. Res.* **2017**, *28*, 742–748. [[CrossRef](#)]
25. Iida, T.; Baba, S.; Botticelli, D.; Masuda, K.; Xavier, S.P. Comparison of histomorphometry and microCT after sinus augmentation using xenografts of different particle sizes in rabbits. *Oral Maxillofac. Surg.* **2020**, *24*, 57–64. [[CrossRef](#)]
26. Busenlechner, D.; Huber, C.D.; Vasak, C.; Dobsak, A.; Gruber, R.; Watzek, G. Sinus augmentation analysis revised: The gradient of graft consolidation. *Clin. Oral Implant. Res.* **2009**, *20*, 1078–1083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Aimetti, M.; Massei, G.; Morra, M.; Cardesi, E.; Romano, F. Correlation between gingival phenotype and Schneiderian membrane thickness. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2008**, *23*, 1128–1132. [[PubMed](#)]
28. Janner, S.F.; Caversaccio, M.D.; Dubach, P.; Sendi, P.; Buser, D.; Bornstein, M.M. Characteristics and dimensions of the Schneiderian membrane: A radiographic analysis using cone beam computed tomography in patients referred for dental implant surgery in the posterior maxilla. *Clin. Oral Implant. Res.* **2011**, *22*, 1446–1453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Scharf, K.E.; Lawson, W.; Shapiro, J.M.; Gannon, P.J. Pressure measurements in the normal and occluded rabbit maxillary sinus. *Laryngoscope* **1995**, *105*, 570–574. [[CrossRef](#)]