



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO



MICHAEL MEDEIROS COSTA

**Comparação de substituto ósseo aloplástico em grânulos ou
pasta em cirurgias de levantamento de seio maxilar. Estudo
experimental em coelhos**

PG.PEriO
FOMP-USP

Ribeirão Preto - SP

2020

MICHAEL MEDEIROS COSTA

Comparação de substituto ósseo aloplástico em grânulos ou pasta em cirurgias de levantamento de seio maxilar. Estudo experimental em coelhos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de Concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Dr. Erick Ricardo Silva

VERSÃO ORIGINAL

Ribeirão Preto – SP

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catlogação na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Costa, Michael Medeiros

Comparação de substitutos ósseos aloplástico em grânulos ou pasta em cirurgias de levantamento de seio maxilar. Estudo experimental em coelhos. Ribeirão Preto, 2020.

111p.: il; 30cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Professor Dr. Erick Ricardo Silva

1. Substitutos ósseos.
2. Histologia.
3. Histomorfometria.
4. Microtomografia.
5. Levantamento de seio maxilar.
6. Coelhos.

Nome: COSTA, Michael Medeiros

Título: Comparação de substitutos ósseos aloplástico em grânulos ou pasta em cirurgias de levantamento de seio maxilar. Estudo experimental em coelhos. Ribeirão Preto, 2020.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia), da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências - Área de Concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

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

A **Deus**, a ti toda honra e glória por mais essa conquista.

A vocês, **amada família**, dedico este trabalho.

Em especial, aos amores da minha vida, a minha esposa **Ingrid Carneiro Cavalcante Souto** e ao meu filho **Gabriel Souto Medeiros**.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu “co-orientador”, **Prof. Dr. Samuel Porfirio Xavier**, notável pesquisador e que tanto tem minha admiração. Acolheu-me com muita prontidão e me permitiu grande crescimento acadêmico e pessoal.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Erick Ricardo Silva**, por quem eu tenho imenso respeito e eterna gratidão. Desde o início da minha jornada no mestrado me deu todo suporte necessário. Obrigado por todos os ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Daniele Botticelli** do Instituto ARDEC Academy, Rimini – Itália, pela colaboração internacional no projeto de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Josenilton de Assis Costa, Rejane de Medeiros Dias Costa** e a minha irmã **Karini Medeiros Costa**, pelo amor, cuidado, confiança e por terem cultivado em mim valores e bons princípios. Obrigado por acreditarem e apostarem nos meus sonhos, pelas orações e suporte emocional. Sem vocês, jamais teria chegado até aqui. Amo muito vocês!

À minha esposa **Ingrid Carneiro Cavalcante Souto**, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo desses anos.

À minha segunda mãe **Alba Gean Lacerda Palmeira**, que mesmo tão distante, torceu e me apoio em todos os momentos. Obrigado pelo grande amor e carinho.

Ao meu sogro **Jacob Souto** e a minha sogra **Patrícia Carneiro**, pelo incentivo e apoio de sempre.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP**, serei eternamente grato pela oportunidade de estudar nesta grande instituição.

Aos meus colegas da equipe de pesquisa, **Vítor Ferreira Balan, Laís Karut Medeiros, Eduardo Pires Godoy, Giovanna Fernandes Guimarães e André Luiz Piola**, pela amizade.

Aos meus amigos de pós-graduação da FORP, **Adriano Lima Garcia, João Lisboa de Sousa Filho, Ítalo Mirando do Vale Pereira, José Henrique Santana Quinto, Denise Weffort, Letícia Faustino Adolpho, Juliana Rodrigues Rozatto, Jaqueline Isadora Reis Ramos, Lucas Moura Sousa, Gabriel Lúcio Calazans Duarte, Lucas Costa Nogueira, Felipe Almeida Costa e Beatriz Roque Kubata**, minha gratidão a todos os momentos compartilhados.

Aos professores **Adalberto Luiz Rosa, Alexandre Elias Trivellato, Cássio Edvard Sverzut, Márcio Mateus Beloti, Mário Taba Junior e Michel Reis Messoria** pela oportunidade de aprendizado e acolhimento, essenciais para o meu crescimento profissional.

Aos professores e colegas, Lucas Martins de Castro e Silva e Fábio Loureiro Sato, pelo incentivo na formação acadêmica.

A todas as secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais e Periodontia, **Aparecida Dulce de Oliveira Negretti, Carla Daniela Lima da Silva, Maria Isabel Gobbo Simonetti** pela disposição, prontidão e carinho.

À técnica do laboratório, **Adriana Luísa Gonçalves Almeida**, agradeço pelas ajudas prestadas durante as análises microtomográficas. **Milla Sprone Tavares Ricoldi e Sebastião Carlos Bianco** pelos ensinamentos e ajuda durante as análises histológicas.

A todos os funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto / USP, em especial **Raphael Martini Vicente, Aldo Dias Feiteiro Júnior, Antônio Massaro e Edson Campos Ribeiro dos Santos**, por todo cuidado com os animais.

Aos **animais** que fizeram parte desta pesquisa.

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”

Robert Collier

RESUMO

COSTA M.M. **Comparação de substituto ósseo aloplástico em grânulos ou pasta em cirurgias de levantamento de seio maxilar. Estudo experimental em coelhos.** 2020. 111p. Dissertação (Mestrado) - Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2020.

O objetivo deste estudo foi comparar o reparo sequencial de seios maxilares enxertados com grânulos ou pasta de um substituto ósseo aloplástico após cirurgias de levantamento de seio maxilar, através de análise microtomográfica, histológica e histomorfométrica. Neste estudo prospectivo, randomizado, do tipo boca dividida, vinte coelhos machos da raça *New Zealand*, pesando 3,5 – 4,0 kg e com 5 – 6 meses de idade, foram utilizados e divididos em 2 grupos de 10 coelhos cada, com eutanásia realizada em 2 e 10 semanas, respectivamente. Após a elevação da membrana sinusal, foi introduzido um substituto ósseo em grânulos (Maxresorb®, Botiss Biomaterials, Zossen, Alemanha) ou em pasta (Maxresorb® inject, Botiss Biomaterials, Zossen, Alemanha). Em seguida, uma membrana de colágeno suíno (Bio-Gide®, Geistlich, Wolhusen, Suíça) foi utilizada para recobrir as antrostomias. Após a eutanásia dos animais, os espécimes removidos foram encaminhados para análise microtomográfica. Com o auxílio do *software* CTAn® (Bruker, Kontich, Bélgica) foi medido o volume total do enxerto (TV, mm³). Para identificação de tecido ósseo mineralizado (*thresholding* 70 -100) e para estruturas de enxerto ósseo residual (*thresholding* 100 - 255). Em seguida, as peças foram processadas para avaliação histológica e histomorfométrica. Os espécimes em resina foram preparados por meio de um equipamento de corte / desgaste de precisão (Exakt, Apparatebau, Norderstedt, Alemanha). E as lâminas foram coradas com azul de toluidina e vermelho de alizarina. Para análise histomorfométrica foram avaliadas cinco diferentes áreas do enxerto ósseo e as porcentagens de osso novo e enxerto residual foram medidas. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância ANOVA e teste *t* de Student. As análises microtomográficas mostraram uma contração volumétrica do biomaterial em ambos os grupos ao longo do tempo. Em relação a quantidade de tecido mineralizado, o grupo grânulos foi de 17,5 ± 3,2 mm³ para 23,2 ± 1,6 mm³ ($p < 0,05$) e o grupo pasta foi de 20,7 ± 9,0 mm³ para 25,2 ± 6,4 mm³, em 2 e 10 semanas, respectivamente. Quando comparado os grupos entre si, observou-se uma maior tendência à formação de tecido mineralizado no grupo grânulos ao longo do tempo, porém sem diferença estatística. Os resultados histomorfométricos mostraram um aumento significativo da quantidade de osso novo ao longo do tempo para ambos os grupos. Entre 2 e 10 semanas, o grupo grânulos aumentou de 1,96 ± 1,35% para 36,8 ± 11,7%; e o grupo pasta de 0,08 ± 0,12% para 25,6 ± 7,6% ($p < 0,05$). O enxerto residual diminuiu em ambos os grupos após 10 semanas de reparo. Conclui-se que as formulações em grânulos e pasta mostraram resultados favoráveis à incorporação, com formação de tecido ósseo em quantidade e qualidade. Porém, o grupo grânulos apresentou uma maior formação de osso novo ao longo do tempo, em todas as análises.

Palavras-chave: Substitutos ósseos, Histologia, Histomorfometria, Microtomografia, Levantamento de seio maxilar, Coelhos.

ABSTRACT

COSTA M.M. **Comparison of alloplastic bone substitute in granules or paste in maxillary sinus augmentation. Experimental study in rabbits.** 2020. 111p. Thesis (Master's Degree) - Ribeirão Preto: University of São Paulo School of Dentistry at Ribeirão Preto, 2020.

The aim of this study was to compare the sequential repair of maxillary sinuses grafted with granules or paste of an alloplastic bone substitute after maxillary sinus augmentation, through microtomographic, histological and histomorphometric analysis. In that prospective, randomized, split-mouth study, twenty New Zealand male rabbits, with 3.5 - 4.0 kg of weight and 5 - 6 months of age, were used and divided into 2 groups of 10 rabbits each, with euthanasia performed at 2 and 10 weeks, respectively. After the elevation of the sinus membrane, a bone substitute was introduced in granules (Maxresorb®, Botiss Biomaterials, Zossen, Germany) or in paste (Maxresorb® inject, Botiss Biomaterials, Zossen, Germany). Then, a porcine collagen membrane (Bio-Gide®, Geistlich, Wolhusen, Switzerland) was used to cover the anastomoses. After the animals were euthanized, the removed specimens were sent for microtomographic analysis. With the aid of the CTAn® software (Bruker, Kontich, Belgium), the total graft volume (TV, mm³) was measured. For identification of mineralized bone tissue (thresholding 70 -100) and for residual bone graft structures (thresholding 100 - 255). Then, the pieces were processed for histological and histomorphometric evaluation. The resin specimens were prepared using precision cutting / wear equipment (Exakt, Apparatebau, Norderstedt, Germany). And the slides were stained with toluidine blue and alizarine red. For histomorphometric analysis, five different areas of the bone graft were evaluated and the percentages of new bone and residual graft were measured. The data obtained were analyzed statistically by means of ANOVA and Student's t analysis of variance. Microtomographic analyzes showed a volumetric contraction of the biomaterial in both groups over time. Regarding the amount of mineralized tissue, the group of granules went from 17.5 ± 3.2 mm³ to 23.2 ± 1.6 mm³ (p < 0.05) and the paste group was 20.7 ± mm³ to 25.2 ± 6.4 mm³, in 2 and 10 weeks, respectively. When the groups were compared, there was a greater tendency for the formation of mineralized tissue in the granules group over time, but there was no statistical difference. Histomorphometric results showed a significant increase in the amount of new bone over time for both groups increased from 1.96 ± 1.35 % to 36.8 ± 11.7% and the paste group from 0.08 ± 0.12% to 25.6 ± 7.6% (p < 0.05). The residual graft decreased in both groups after 10 weeks of repair. It is concluded that the formulations in granules and paste presented favorable results to the incorporation, with formation of bone tissue in quantity and quality. However, the granules group showed greater formation of new bone over time, in all analyzes.

Keywords: Bone substitutes, Histology, Histomorphometry, Microtomography, Maxillary Sinus surgery, Rabbits.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	A. Marcação das antrostomias com broca trefina; B. Antrostomia (janela óssea) realizada por desgaste com ponta esférica diamantada, para posterior elevação da membrana sinusal.....	47
Figura 2.	A. Substituto ósseo aloplástico em grânulos; B. Substituto ósseo aloplástico na forma de pasta injetável.....	48
Figura 3.	A. Enxertos ósseos e parafuso posicionado; B. Membrana de colágeno porcino posicionada (Bio-Gide®, Geistlich, Wolhusen, Suíça).....	48
Figura 4.	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.....	49
Figura 5.	Determinação das regiões de interesse (ROI) dos espécimes por meio do software CTAn® 1.17.7.2 + (Bruker, Kontich, Bélgica).....	50
Figura 6.	Binarização das imagens e determinação da escala de cinza (<i>thresholding</i> 70 – 100) para identificação de tecido mineralizado pelo software CTAn® 1.17.7.2 + (Bruker, Kontich, Bélgica).....	51
Figura 7.	Binarização das imagens e determinação da escala de cinza (<i>thresholding</i> 100 – 255) para identificação de enxerto ósseo residual pelo software CTAn® 1.17.7.2 + (Bruker, Kontich, Bélgica).....	51
Figura 8.	A e B. Exemplo de corte trans axial realizado no equipamento Exakt (Apparatebau, Norderstedt, Alemanha), no laboratório de Histologia da FORP-USP.....	52
Figura 9.	Microscópio de luz Leica DMLB (Leica, Wetzlar, Alemanha) do laboratório 3D Bio FORP-USP.....	53
Figura 10.	Cinco áreas distintas do corte histológico foram utilizadas para análises histológica e histomorfométrica, como mostram os quadrados na figura. A = região da antrostomia, C= região central do enxerto, S= região próxima à membrana sinusal, M= região próxima à parede medial e L= região próxima à parede lateral. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação 16x.....	54
Figura 11.	Uma grade contendo 80 pontos foi sobreposta às fotomicrografias das lâminas histológicas com o auxílio do <i>software</i> ImageJ® 1.50i (National Institutes of Health, EUA). Todos os pontos de intersecção entre os quadrados foram utilizados para contabilizar as estruturas histológicas. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação 100x.....	54

Figura 12.	Imagens tridimensionais dos seios maxilares contendo ambos os enxertos, realizado por meio do software CTVox® (Bruker, Kontich, Bélgica). Os grupos grânulos (círculo vermelho) e pasta após 2 e 10 semanas de reparo.....	59
Figura 13.	Fotomicrografia histológica de dois seios maxilares elevados, (A) grupo grânulos e (B) grupo pasta no período de 2 semanas. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 16x.....	62
Figura 14.	Fotomicrografia histológica de dois seios maxilares elevados, (A) grupo grânulos e (B) grupo pasta no período de 10 semanas. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 16x.....	63
Figura 15.	Fotomicrografia histológica da região lateral do enxerto em ambos os grupos com 2 semanas de reparo. Observa-se no grupo grânulos (A) neoformação óssea e os espaços entre as partículas preenchidos por tecido conjuntivo vascularizado. No grupo pasta (B) , notou-se partículas de menor diâmetro e a presença do gel a base de água. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 100x.....	64
Figura 16.	Fotomicrografia histológica da região medial do enxerto em ambos os grupos com 2 semanas de reparo. Observa-se no grupo grânulos (A) neoformação óssea e os espaços entre as partículas preenchidos por tecido conjuntivo vascularizado. No grupo pasta (B) , notou-se partículas de menor diâmetro e a presença da pasta envolta por tecido conjuntivo vascularizado. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 100x.....	64
Figura 17.	Fotomicrografia histológica da região lateral do enxerto em ambos os grupos com 10 semanas de reparo. Observa-se no grupo grânulos (A) partículas do biomaterial e os espaços entre as partículas foram preenchidos por tecido ósseo maduro e tecido conjuntivo vascularizado. No grupo pasta (B) , notou-se partículas do biomaterial e uma diminuição expressiva da quantidade de pasta. Os espaços entre as partículas e a pasta estavam preenchidos com tecido conjuntivo vascularizado. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 100x.....	65

Figura 18. Fotomicrografia histológica da região mais próxima da parede medial, em ambos os grupos com 10 semanas de reparo. No grupo grânulos **(A)**, observa-se grandes quantidades de partículas do biomaterial e os espaços entre as partículas foram preenchidos por tecido ósseo maduro e tecido conjuntivo vascularizado. No grupo pasta **(B)**, notou-se poucas partículas do biomaterial e uma diminuição expressiva da quantidade de pasta. Os espaços entre as partículas e a pasta estavam preenchidos com tecido ósseo maduro e tecido conjuntivo vascularizado. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 100x.....

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Avaliação microtomográfica com porcentagens comparativas de osso novo em 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos como média \pm desvio padrão, ^a $p < 0,05$: análise intragrupo; ^b $p < 0,05$: análise entre grupos..... **60**
- Gráfico 2.** A Avaliação microtomográfica com porcentagens comparativas de osso novo em 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos como média \pm desvio padrão, ^a $p < 0,05$: análise intragrupo; ^b $p < 0,05$: análise entre grupos..... **61**
- Gráfico 3.** Avaliação histomorfométrica com porcentagem comparativas de osso novo em 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos como média \pm desvio padrão, ^a $p < 0,05$: análise intragrupo; ^b $p < 0,05$: análise entre grupos..... **67**
- Gráfico 4.** Avaliação histomorfométrica com porcentagem comparativas de osso novo de cada região avaliada (A = Região da antrostomia; C = Região central do enxerto; S = região próxima a membrana sinusal; M = próximo a parede medial e L = próximo a parede lateral), em 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos como média \pm desvio padrão, ^a $p < 0,05$: análise entre grupos..... **68**
- Gráfico 5.** Avaliação histomorfométrica com porcentagens comparativas de enxerto ósseo residual contidos no grupo grânulos, no grupo pasta e quantidade de grânulos presentes na pasta, em 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos com média \pm desvio padrão, ^a $p < 0,05$: análise intragrupos; ^b $p < 0,05$: análise entre grupos..... **69**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Volume total do enxerto dos grupos grânulos e pasta (TV, mm ³) após 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos como média ± desvio padrão, ^a p < 0,05: análise intragrupo; ^b p < 0,05: análise entre grupos.....	59
Tabela 2.	Volume de tecido mineralizado em mm ³ (<i>tresholding</i> 70 - 100) de ambos os grupos, após 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos como média ± desvio padrão, ^a p < 0,05: análise intragrupo; ^b p < 0,05: análise entre grupos.....	60
Tabela 3.	Volume de enxerto ósseo residual em mm ³ (<i>tresholding</i> 100 - 255) após 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos como média ± desvio padrão, ^a p < 0,05: análise intragrupo; ^b p < 0,05: análise entre grupos.....	61
Tabela 4.	Média e desvio padrão de análise histomorfométrica de neoformação óssea dos grupos grânulos e pasta, em 2 e 10 semanas. Valores expressos como média ± desvio padrão, ^a p < 0,05: análise intragrupo; ^b p < 0,05: análise entre grupos.....	66
Tabela 5.	Porcentagem de neoformação óssea dos grupos grânulos e pasta, através da análise histomorfométrica da média das regiões próximas as paredes ósseas (parede lateral + parede medial) e da região central do enxerto, em 2 e 10 semanas. Valores expressos como média ± desvio padrão, ^a p < 0,05.....	68
Tabela 6.	Média e desvio padrão de análise histomorfométrica de enxerto ósseo residual do grupo grânulos, pasta e grânulos contidos na pasta, em 2 e 10 semanas. Valores expressos como média ± desvio padrão, ^a p < 0,05: análise intragrupo; ^b p < 0,05: análise entre grupos.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
i.m	Intramuscular
s.c	Subcutânea
USP	Universidade de São Paulo
TV	Volume total da amostra
BV/TV	Razão entre o volume ósseo e o volume da amostra
3D	Tridimensional
MicroCT	Microtomografia computadorizada
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
VOI	Volume ósseo de interesse
ROI	Região óssea de interesse
CTAN	Software de Análise Morfométrica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
µA	Microampère
kV	Quilovolt
CO²	Dióxido de carbono
ms	Milissegundo
HA	Hidroxiapatita
β-TCP	Beta-fosfato tricálcio
Al	Alumínio
Cu	Cobre

LISTA DE SÍMBOLOS

® Registrada

% Por cento

mm^3 Milímetros cúbicos

Nº Número

°C Escala Celsius

± Mais ou menos

~ Aproximação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	33
2. PROPOSIÇÃO	39
2.1 Objetivo Geral.....	41
2.2 Objetivos Específicos	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Seleção da Amostra	45
3.2 Randomização.....	45
3.3 Manutenção dos animais.....	46
3.4 Procedimento cirúrgico.....	46
3.5 Eutanásia.....	49
3.6 Processamento e análise microtomográfica (MicroCT).....	49
3.7 Processamento histológico.....	51
3.8 Calibração do examinador.....	52
3.9 Análises histológicas e histomorfométrica.....	53
3.10 Análise estatística.....	55
4. RESULTADOS	57
4.1 Avaliação microtomográfica	59
4.1.1 Volume total do enxerto.....	59
4.1.2 Volume de tecido mineralizado	60
4.1.3 Volume de enxerto ósseo residual.....	61
4.2 Avaliação histológica descritiva.....	62
4.3 Avaliação histomorfométrica	66
4.3.1 Avaliação de osso novo.....	66
4.3.2 Avaliação de enxerto ósseo residual	69
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXOS	89

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Implantodontia desempenha papel importante na reabilitação oral de pacientes desdentados, sendo considerada uma alternativa às próteses fixas e removíveis convencionais. Essa opção terapêutica possibilita restabelecer função e estética dos pacientes de maneira eficaz e previsível. O planejamento cirúrgico deve levar em consideração a quantidade e qualidade do osso alveolar remanescente e também o posicionamento tridimensional do implante para correta reabilitação protética final (CORBELLA *et al.*, 2016; SAKKAS *et al.*, 2017).

A reabsorção do processo alveolar na região posterior da maxila e a consequente pneumatização dos seios maxilares podem dificultar a instalação de implantes osseointegráveis nesta região (ARAUJO; LINDHE, 2005; DEL FABBRO; WALLACE; TESTORI, 2013). Diante disso, a utilização de enxertos e/ou substitutos ósseos têm sido empregada há vários anos no intuito de compensar as alterações de reabsorção após exodontias e restabelecer o volume ósseo perdido, possibilitando a instalação de implantes osseointegráveis com altas taxas de sucesso em sítios enxertados (DONOS *et al.*, 2008; KONERMANN *et al.*, 2014; DAWSON III *et al.*, 2019).

Apesar da crescente utilização dos biomateriais, o enxerto ósseo autógeno ainda é considerado padrão ouro, para os procedimentos de enxertia óssea. (INTINI *et al.*, 2008; JENSEN; TERHEYDEN, 2009; SAKKAS *et al.*, 2017; DAWSON III *et al.*, 2019). Todavia, a utilização do osso autógeno nas cirurgias de aumento ósseo está associada a uma série de desvantagens, tais como: disponibilidade óssea limitada, morbidade cirúrgica aumentada, maior tempo cirúrgico, risco aumentado de parestesias e infecções, custo financeiro aumentado e necessidade de hospitalização nos casos de sítio doador extra-bucal (AHLMANN *et al.*, 2002; GAMRADT; SOHN *et al.*, 2009).

A fim de contrapor as desvantagens da utilização do osso autógeno em cirurgias maxilares, pesquisas com a utilização de enxertos xenógenos e aloplásticos ganharam força e têm sido amplamente utilizados nas cirurgias de levantamento de seio maxilar (CAMPANA *et al.*, 2014; MORDENFELD, LINDGREN, HALLMAN., 2016; DELGADO-RUIZ, CALVO GUIRADO E ROMANOS, 2018). No entanto, a possibilidade de indução de doenças no hospedeiro por meio de *prions* contidos no interior de enxertos xenógenos redirecionou o foco das pesquisas atuais

para utilização de materiais sintéticos, denominados aloplásticos (KIM, NOWZARI, RICH, 2013; KIM, RODRIGUEZ, NOWZARI, 2016).

Nesse contexto, as cerâmicas sintéticas a base de fosfato de cálcio, têm sido amplamente difundidas e utilizadas, principalmente a hidroxiapatita (HA), β -fosfato tricálcico (β -TCP) ou a mistura de ambos (HA / β -TCP). Esses biomateriais apresentam-se na forma de blocos, grânulos ou pastas injetáveis, possuindo biocompatibilidade e alta capacidade osteocondutora. (LINDGREN *et al.*, 2009; WALLACE, FROUM, 2003; DUTTA *et al.*, 2015).

Uma alta concentração de β -TCP em um material substituto ósseo se caracteriza por maior reabsorção do enxerto no período de incorporação, com consequente diminuição do volume ósseo. Contudo, uma menor concentração desse mesmo componente pode diminuir o potencial de neoformação óssea. A taxa de absorção do β -TCP em comparação a HA é mais rápida, propiciando a criação de espaços que favorecem o preenchimento por células osteoprogenitoras, bem como acelera o processo de regeneração óssea (FARIÑA *et al.*, 2008; LIM *et al.*, 2016). Estudos apontam que a taxa de absorção do β -TCP é três a doze vezes mais rápida que a da HA (SCHAEFER *et al.*, 2011).

Os enxertos de HA têm demonstrado resultados previsíveis e satisfatórios quando utilizados em cirurgias de levantamento de seio maxilar (MANGANO *et al.*, 2013). Uma das principais vantagens da HA, em comparação com os demais substitutos ósseos, é a sua baixa taxa de absorção, o que confere ao enxerto estabilidade volumétrica e resistência mecânica em longo prazo, ou seja, atua como suporte para migração de células e deposição de matriz óssea (OHSAWA, 2000; DUTTA *et al.*, 2015; ZIZZARI *et al.*, 2016).

Frente a isso, as cerâmicas bifásicas de HA / β -TCP têm sido muito estudadas em ensaios pré-clínicos e clínicos, e a associação desses dois biomateriais em único produto possibilita uma melhor manutenção volumétrica tridimensional do enxerto pela presença da HA e a rápida neoformação óssea devido a reabsorção do β -TCP, quando comparadas às suas formas isoladas (JELUSIC *et al.*, 2017; OHAYON, 2014; LIM *et al.*, 2016).

O Maxresorb® é um substituto de enxerto ósseo de origem aloplástica, disponibilizado comercialmente na forma de grânulos ou pasta. A formulação em grânulos é constituída por uma combinação de HA e β -TCP, na proporção 60:40, sendo composta de macroporos de 200 - 800 μ m e porosidade de 80%. Sua

composição osteocondutora possibilita a perfusão sanguínea, facilitando a adesão e crescimento celulares (KONERMANN *et al.*, 2014; JUNG *et al.*, 2017).

Por outro lado, a formulação em pasta injetável (Maxresorb® Inject) constitui-se de uma pasta de absorção controlada contendo nanopartículas de HA e pequenos grânulos de HA e β -TCP (também na proporção 60:40), dispersos em um gel de base aquosa. As nanopartículas de HA (tamanho 15 – 50 nm) fornecem uma extensa área de superfície para interações celulares, promovendo assim neoformação óssea. Além disso, os grânulos de HA podem contribuir para estabilidade volumétrica em longo prazo. Do ponto de vista clínico, por ser uma formulação viscosa e não endurecedora apresenta facilidade de manipulação e de adaptação ao sítio receptor (<<https://botiss-dental.com/products/maxresorb-inject/>>. Acesso em: 20 jul. 2020).

Oh *et al.* (2019), em um estudo clínico prospectivo envolvendo 58 pacientes submetidos a cirurgias de levantamento de seio maxilar, compararam microtomográfica e histomorfometricamente dois materiais de enxerto ósseo: o fosfato de cálcio bifásico (composto por 60HA / 40 β -TCP) e o enxerto mineral ósseo bovino desproteínizado (Bio-Oss®). Após 6 meses, esses autores observaram que a neoformação óssea prevaleceu no grupo de pacientes submetidos ao enxerto que continha fosfato de cálcio bifásico, em ambas análises.

No entanto, não há até a presente data nenhum estudo comparando o comportamento biológico dessas duas formulações, dos pontos de vista microtomográfico e histomorfométrico. Portanto, este foi o primeiro trabalho a comparar a associação HA / β -TCP em forma de pasta ou grânulos em um modelo animal de levantamento de seio maxilar.

2. PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

Comparar os processos de incorporação e neoformações ósseas de um biomaterial aloplástico bifásico em grânulos ou pasta à base de hidroxiapatita (60%) e beta-fosfato tricálcio (40%) em cirurgias de levantamento de seio maxilar em coelhos, por meio de análise microtomográfica e histomorfométrica.

2.2 Objetivos Específicos

Correlacionar os achados microtomográficos com o comportamento volumétrico das duas formulações do biomaterial nos períodos experimentais propostos.

Avaliar o processo de neoformação e incorporações ósseas nas diferentes áreas dos seios maxilares enxertados.

Investigar a influência do osso nativo presente nas paredes das antrostomias sobre a formação de osso novo, em comparação com a região central do enxerto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil (CEUA nº: 2018.1.842.58.2 – ANEXO A).

3.1 Seleção da Amostra

Neste estudo, prospectivo, randomizado, do tipo boca dividida, foram utilizados vinte coelhos adultos machos da raça *New Zealand White*, pesando aproximadamente 3,5 - 4,0 kg e 5 - 6 meses de idade. Os animais foram divididos em dois grupos de dez coelhos cada, de acordo com os períodos experimentais de 2 e 10 semanas.

O modelo experimental do tipo boca dividida elimina a interferência entre indivíduos de um mesmo grupo e possibilita a utilização de um número reduzido de animais para garantir representatividade da amostra. O resultado do cálculo amostral obtido pelo *software* G*Power 3.1 para este estudo (considerando alfa = 0.05, poder do teste = 0.8, correlação entre medidas de 0.5), à semelhança do que foi realizado em estudos prévios.

Dessa forma, para esta configuração, o tamanho amostral foi de dez animais por grupo (2 grupos, $n = 10$), de modo que fosse possível encontrar significância estatística entre os grupos experimentais.

3.2 Randomização

A randomização entre os lados grânulos e pasta foi realizada eletronicamente (<http://www.randomization.com>) por um colaborador que não esteja envolvido no manuseio dos animais e/ou nos procedimentos cirúrgicos. O tratamento a ser realizado foi informado ao cirurgião imediatamente após a realização das antrostomias dos seios maxilares bilateralmente.

Nenhuma informação das análises histológica e microtomográfica foram fornecidas aos examinadores com relação ao tipo de enxerto e/ou períodos de avaliação.

3.3 Manutenção dos animais

Após chegarem ao Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP), os animais passaram por um período de quarentena supervisionada, para o ganho de peso e verificação de possíveis alterações de comportamento.

Todos os animais foram mantidos em gaiolas de aço individuais (1,0 animal / 4500 cm²), sob apropriados cuidados veterinários e suporte nutricional. Os animais ficaram alojados em sala que contava com ar condicionado *Split* (21° C), exaustor (27 a 34 trocas de ar / hora) e controle de iluminação automático (ciclo claro-escuro de 12 horas). Os animais receberam ração e água filtrada *ad libitum*.

Foi realizado um protocolo de monitorização dos animais durante todo o período experimental, por meio de atenção às funções biológicas básicas, aos sinais de comportamento em relação à dor pós-operatória e avaliação das feridas operatória quanto a sangramentos, deiscência de sutura e / ou sinais de infecção.

3.4 Procedimento cirúrgico

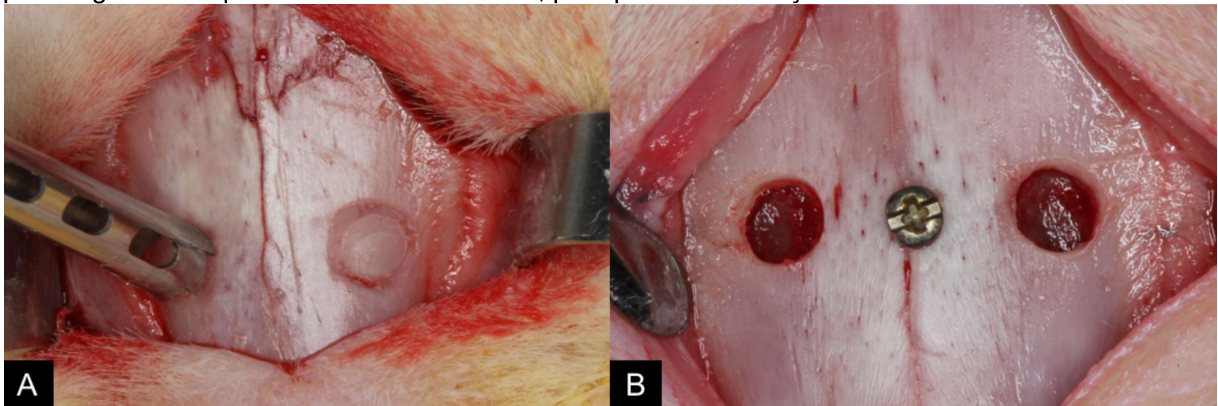
Todas as cirurgias foram realizadas por um cirurgião Buco-Maxilo-Facial treinado. A anestesia foi realizada utilizando acepromazina (1,0 mg / kg, s.c., Acepran®, Vetnil, Louveira, São Paulo, Brasil) e com uma solução de xilazina (3,0 mg / kg i.m., Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio LTDA, Paulínia, São Paulo, Brasil) e cetamina (50,0 mg / Kg i.m., Dopaser®, Sespo Indústria e Comércio LTDA, Paulínia, São Paulo, Brasil). Após a anestesia, os animais receberam uma dose profilática de oxitetraciclina di-hidratada (40 mg / kg, i.m., Terramicina LA®, Zoetis Indústria e Produtos Veterinários, Campinas, São Paulo, Brasil), cetoprofeno 1% (Ketofen, Bimeda-Mogivet Farmacêutica S.A., 3,0 mg / kg, i.m.; Monte-Mor, São Paulo, Brasil) e cloridrato de tramadol (1,0 mg / kg; s.c.; Halexlstar; Goiânia, Goiás, Brasil). As medicações anti-inflamatória e analgésica foram mantidas nos primeiros três dias de pós-operatório.

Após a tricotomia, realizou-se antissepsia do dorso nasal por meio da aplicação tópica de solução aquosa de iodo polivinil-pirrolidona a 1% (Riodeíne® Tintura, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) e aposição de adesivo transparente básico (3M, Sumaré, São Paulo, Brasil) estéril, para proteção

da ferida cirúrgica. O local da incisão foi infiltrado com $1/2$ tubete de mepivacaína 2% e epinefrina a 1:100.000 (Mepiadre®, Nova DFL, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). Uma incisão de aproximadamente 2,0 cm de comprimento foi realizada ao longo da linha média do dorso nasal, seguida da divulsão dos tecidos até o periósteo e descolamento periosteal. Com o osso nasal exposto, têm-se como limites a sutura nasoincisa e a sutura nasofrontal.

Com o auxílio de trefina de 3,0 mm de diâmetro e broca esférica diamantada (Figura 1A; Neodent, Curitiba, Paraná, Brasil), sob irrigação constante com solução salina estéril, realizou-se as janelas ósseas em ambos os lados do dorso nasal, conforme protocolo já realizado e publicado por nosso grupo de pesquisa (Figura 1B; IIDA *et al.*, 2017).

Figura 1. **A.** Marcação das antrostomias com broca trefina; **B.** Antrostomia (janela óssea) realizada por desgaste com ponta esférica diamantada, para posterior elevação da membrana sinusal.

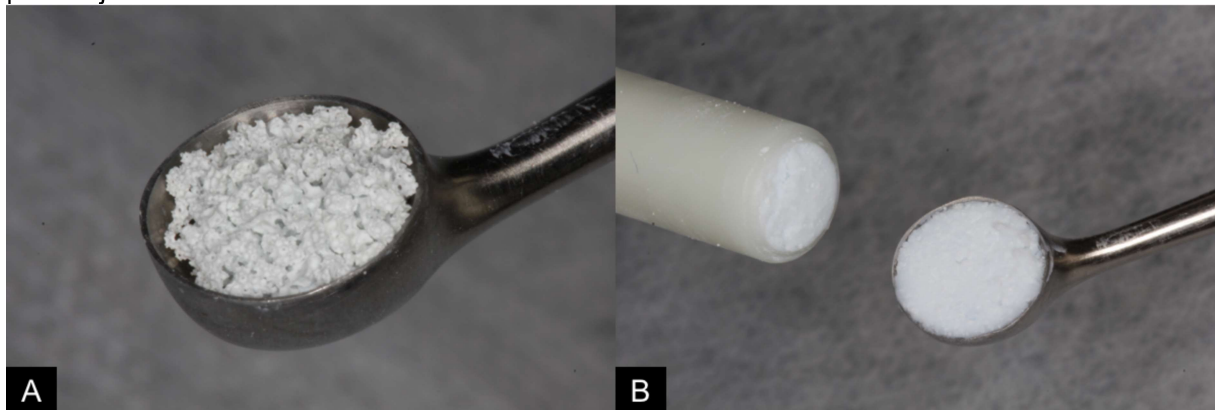


Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

Após a elevação da membrana sinusal, volumes fracionados previamente ($\sim 100 \text{ mm}^3$) de substituto ósseo aloplástico sintético em formulação grânulos ou pasta foram introduzidas nos seios maxilares bilateralmente, de forma randomizada com o auxílio de pinça “porta-amálgama” e curetas de seio maxilar. Ambas as formulações são constituídas por uma associação de hidroxiapatita e beta fosfato tricálcio, na proporção 60:40, respectivamente.

Um lado recebeu o material na formulação em grânulos (Maxresorb®, Botiss Biomaterials, Zossen, Alemanha, Figura 2A). O outro lado recebeu o material na forma de pasta injetável quadrifásica (Maxresorb® inject, Botiss Biomaterials, Zossen, Alemanha, Figura 2B).

Figura 2. A. Substituto ósseo aloplástico em grânulos; **B.** Substituto ósseo aloplástico na forma de pasta injetável.

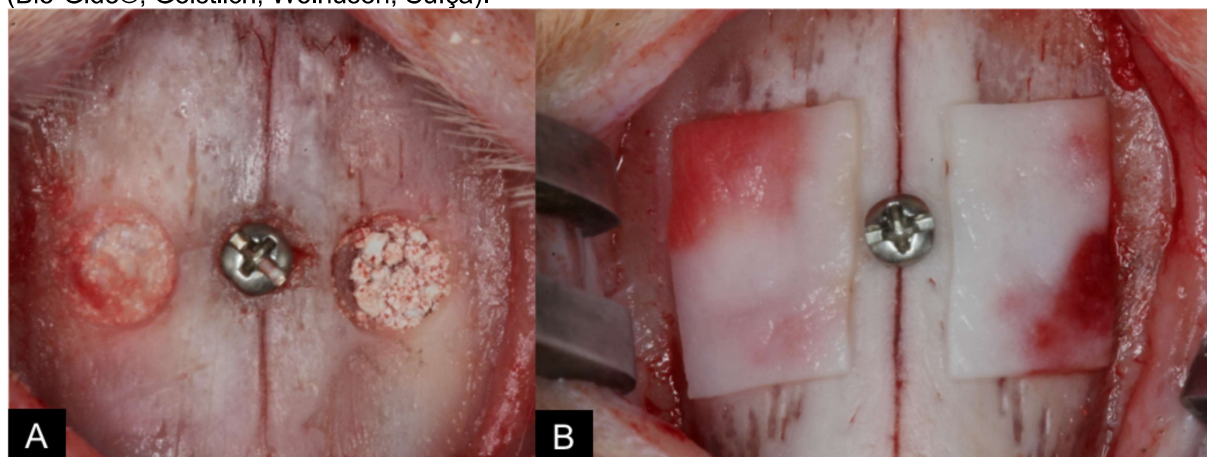


Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

Como referência central dos enxertos, posicionou-se um parafuso metálico na sutura nasal-incisal, ao nível do centro de ambas as janelas (Figura 3A). Uma membrana de colágeno suíno absorvível (Bio-Gide®, Geistlich, Wolhusen, Suíça) foi utilizada para cobrir as antrostomias bilateralmente (Figura 3B).

Para sutura, utilizou-se Vycril® 4-0 (Ethicon®, Johnson&Johnson®, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) no periósteo e nos planos musculares e Nylon 4-0 (Ethicon®, Johnson&Johnson®, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) na pele.

Figura 3. A. Enxertos ósseos e parafuso posicionado; **B.** Membrana de colágeno porcino posicionada (Bio-Gide®, Geistlich, Wolhusen, Suíça).



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

3.5 Eutanásia

Após os períodos de 2 e 10 semanas ($n = 10$ animais / período), os coelhos foram submetidos à eutanásia pelo método de sobredose de anestésico com xilazina (3,0 mg / kg i.m., Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio LTDA, Paulínia, São Paulo, Brasil) e cetamina (50,0 mg / kg i.m., Dopaser®, Sespo Indústria e Comércio LTDA, Paulínia, São Paulo, Brasil), em seguida, os animais foram posicionados em uma caixa fechada de acrílico transparente contendo gás carbônico (CO₂).

Um bloco da região nasal de cada animal, contendo os dois seios maxilares preenchidos, foi cuidadosamente coletado e imediatamente submersas em solução tamponada de formaldeído a 10%.

3.6 Processamento e análise microtomográfica (MicroCT)

Após a fixação, as peças foram submetidas a uma varredura de feixe de raios-X no microtomógrafo de alta resolução (SkyScan 1172®, Bruker, Kontich, Bélgica) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP (Figura 4).

Figura 4. 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.



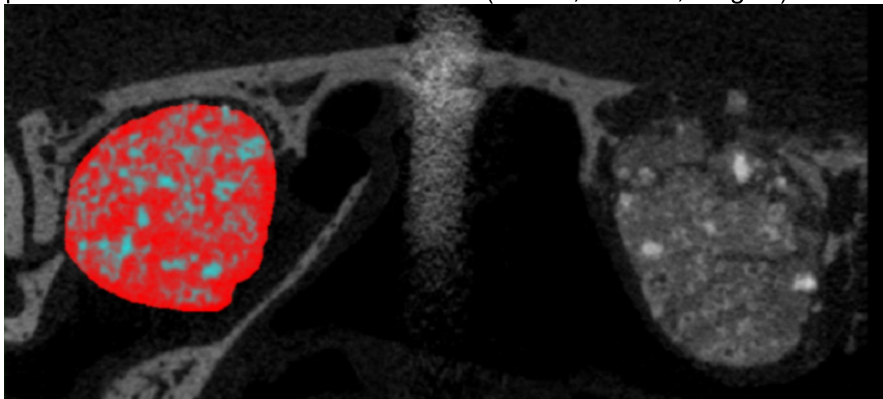
Fonte: www.bruker.com/pt/products/microtomography/microctforsamplescanning/skyscan1172/overview.

Utilizou-se os seguintes parâmetros de escaneamento: exposição de 570 ms por movimento, voltagem de 89 kV, corrente de 112 μ A, resolução isotrópica de 8,70 μ m, 360° de rotação em torno do eixo vertical com passo de rotação 0,2°, média de 4 quadros, utilizando um filtro de Al + Cu.

A etapa seguinte consistiu na reconstrução das imagens utilizando o *software* NRecon® 1.6.10 (Bruker, Kontich, Belgium), seguiu-se os parâmetros a seguir: diminuição de artefatos em forma de anel (Ring Artifact Correction) no valor de 12, endurecimento de feixe (Beam Hardening) de 34% e suavização (Smoothing) no valor de 2. As imagens reconstruídas foram reposicionadas tridimensionalmente por meio do *software* DataViewer® 1.5.4.6 (Bruker, Kontich, Belgium), no qual foi determinado o volume de interesse (VOI) dos espécimes.

Após a obtenção do VOI, o *software* CTAn® 1.17.7.2 + (Bruker, Kontich, Bélgica) foi utilizado para realizar as mensurações por meio da interpolação das Regiões de Interesse (ROI) marcando somente as áreas enxertadas em ambos os seios maxilares dos coelhos (Figura 5).

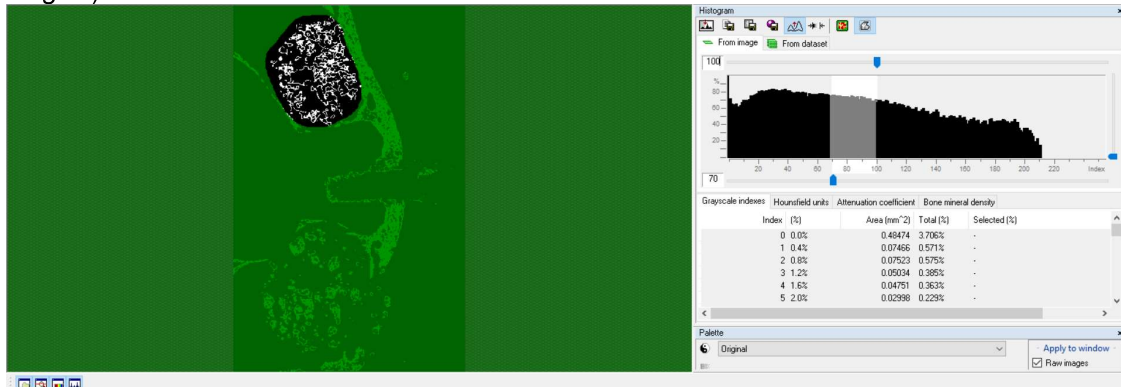
Figura 5. Determinação das regiões de interesse (ROI) dos espécimes por meio do *software* CTAn® 1.17.7.2 + (Bruker, Kontich, Bélgica).



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

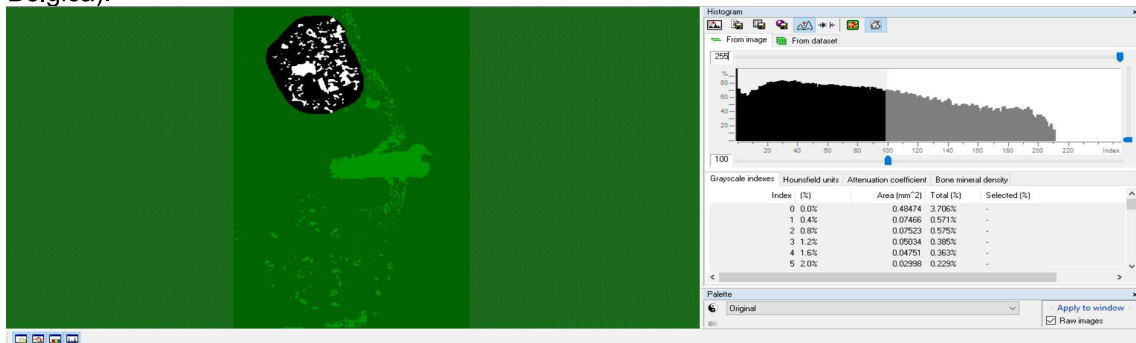
Em seguida, as imagens foram binarizadas e a escala de cinza (*thresholding*) foi determinada em dois limiares diferentes. Para identificação de tecido mineralizado, os limites dessa escala foram fixados nos valores de 70 – 100 e para identificação de estruturas de enxerto ósseo residual foi de 100 – 255, conforme publicado em estudo anterior (Figura 6 e 7; IIDA *et al.*, 2020).

Figura 6. Binarização das imagens e determinação da escala de cinza (*thresholding* 70 – 100) para identificação de tecido mineralizado pelo software CTAn® 1.17.7.2 + (Bruker, Kontich, Bélgica).



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

Figura 7. Binarização das imagens e determinação da escala de cinza (*thresholding* 100 – 255) para identificação de enxerto ósseo residual pelo software CTAn® 1.17.7.2 + (Bruker, Kontich, Bélgica).



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

O volume total do enxerto (TV) e volume de tecido mineralizado (BV/TV: osso novo + enxerto residual) foram obtidos pela análise morfométrica tridimensional da interpolação total das regiões de interesse (ROI) de cada amostra. Um único examinador calibrado realizou todas as análises.

3.7 Processamento histológico

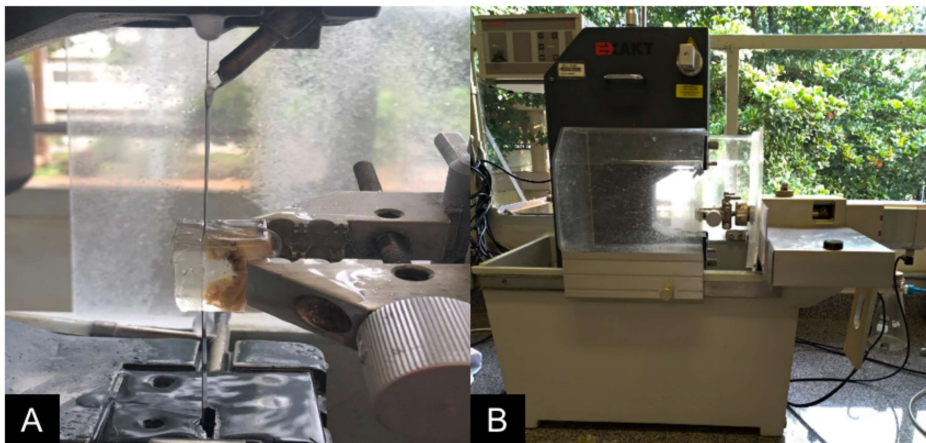
Após análise microtomográfica, os espécimes foram levados ao Laboratório de Histologia da FORP-USP, para início da preparação histológica. Inicialmente, as peças foram lavadas em água corrente, para remoção completa do agente fixador. Em seguida, foram desidratadas em uma série de álcoois de concentrações crescentes, trocadas a cada três dias, sob agitação constante.

Posteriormente, os espécimes foram embebidos em resina (LR White™ HardGrid, Londo Resin Co Ltd, Berkshire, Reino Unido), para impregnação e

posterior polimerização, em estufa a 60°C. Concluída a fase de polimerização, cada bloco foi cortado em plano coronal, no centro da área elevada, utilizando-se como referência o parafuso metálico posicionado na sutura naso-incisal (Figura 8A).

Duas secções de aproximadamente 100 – 150 µm foram preparadas por meio de um equipamento de corte / desgaste de precisão (Exakt, Apparatebau, Norderstedt, Alemanha) (Figura 8B) e lixadas até que sejam obtidas lâminas histológicas com espessura aproximada de 50 – 60 µm. As lâminas foram coradas com Azul de Toluidina e com Vermelho de Alizarina, como realizado em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa (IIDA *et al.*, 2017; OMORI *et al.*, 2018).

Figura 8. A e B. Exemplos de corte trans axial realizado no equipamento Exakt (Apparatebau, Norderstedt, Alemanha), no laboratório de Histologia da FORP-USP.



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

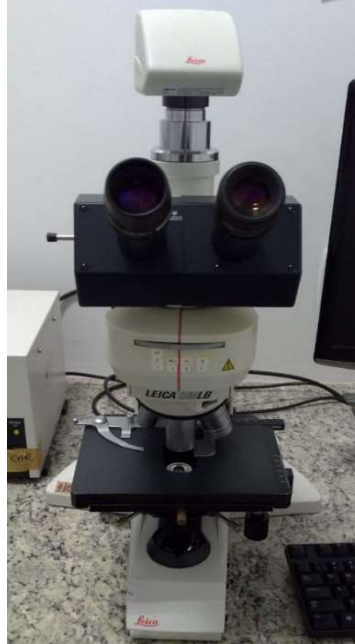
3.8 Calibração do examinador

As análises foram feitas por um único examinador (MMC), após treinamento com um profissional experiente. As medidas dentro de cada área foram tomadas duas vezes consecutivas e uma média foi calculada. Um teste Kappa intra-examinador foi aplicado, para reconhecimento de estruturas histológicas, tendo alcançado um índice superior a 0,90.

3.9 Análises histológicas e histomorfométrica

Um microscópio óptico Leica DMLB[®] (Leica, Wetzlar, Alemanha), equipado com uma câmera digital (Digital Sight DS-2Mv, Nikon Corporation, Tóquio, Japão) conectada a um computador, foi utilizado para as análises histológicas (Figura 9). As imagens analisadas foram obtidas em lente objetiva de 1.6x e 10x.

Figura 9. Microscópio de luz Leica DMLB[®] (Leica, Wetzlar, Alemanha) do laboratório 3D Bio FORP-USP.

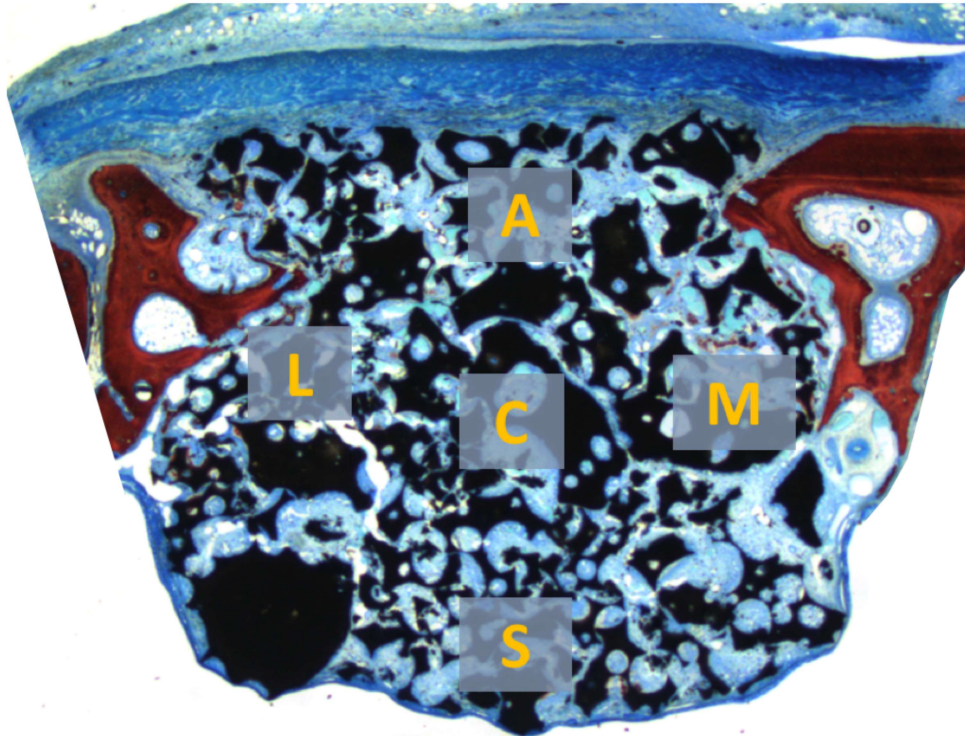


Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

Cinco áreas distintas, do local enxertado, foram determinadas e usadas para as análises. A área mais próxima à membrana de colágeno foi chamada de “região da antrostomia (A)”, as áreas próximas das paredes ósseas de “parede medial (M) e parede lateral (L)”, a área central do enxerto de “região do centro (C)” e a área próxima da membrana sinusal de “região da membrana sinusal (S)” (Figura 10).

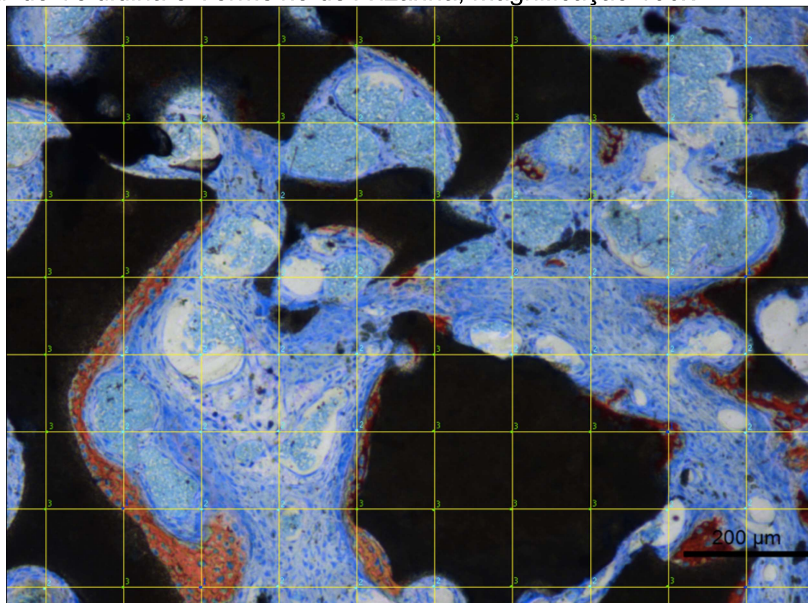
O *software* Image J 1.50i (Nacional Institutes of Health, EUA) foi utilizado para as mensurações. Uma grade de 80 quadrados foi sobreposta às imagens das lâminas histológicas (Figura 11), e os pontos de interseção entre os quadrados foram utilizados como referência para contabilizar as estruturas presentes, em cada uma das cinco áreas, com magnificação de 100x.

Figura 10. Cinco áreas distintas do corte histológico foram utilizadas para análises histológica e histomorfométrica, como mostram os quadrados na figura. A = região da antrostomia, C = região central do enxerto, S = região próximo à membrana sinusal, M = região próxima à parede medial e L = região próxima à parede lateral. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação 16x.



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

Figura 11. Uma grade contendo 80 pontos foi sobreposta às fotomicrografias das lâminas histológicas com o auxílio do *software* ImageJ® 1.50i (National Institutes of Health, EUA). Todos os pontos de intersecção entre os quadrados foram utilizados para contabilizar as estruturas histológicas. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação 100x.



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

As medidas histomorfométricas foram calculadas separadamente para cada área. Valores de média e desvio padrão foram calculados para avaliar a neoformação óssea (variável primária) e a reabsorção do enxerto. As estruturas avaliadas incluíram porcentagens de osso novo mineralizado, de grânulos, de pasta e de grânulos presentes na pasta. Além disso, realizou-se uma média da porcentagem de osso novo nas regiões das paredes ósseas (parede lateral + parede medial) e região central do enxerto. Em seguida, uma análise descritiva dos achados histológicos em cada um dos períodos experimentais foi realizada.

3.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística utilizando o *software* IBM SPSS Statistic (IBM Inc., Chicago, EUA). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A normalidade dos resíduos foi realizada através do teste de Shapiro-Wilk. Para comparar a neoformação óssea entre os grupos de grânulos e pasta e entre os dois períodos de avaliação, foi utilizado um teste ANOVA *two-way*. Para comparação entre grupos do mesmo período de avaliação, foi realizado o teste *t* de Student. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação microtomográfica

4.1.1 Volume total do enxerto

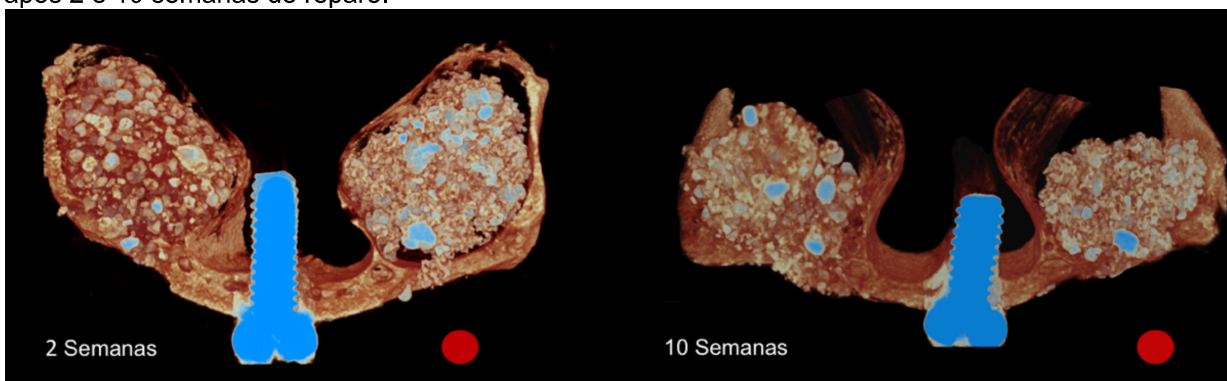
Foi observado uma contração volumétrica do enxerto ao longo do tempo, em ambos os grupos. Entre 2 e 10 semanas de cicatrização, os volumes totais (TV) dos grupos grânulos e pasta diminuíram de $104,8 \pm 20,9 \text{ mm}^3$ para $74,1 \pm 16,0 \text{ mm}^3$ e de $133,7 \pm 34,6 \text{ mm}^3$ para $88,3 \pm 38,6 \text{ mm}^3$, o que representa uma redução de 29,5% e de 33,9% respectivamente ($p < 0,05$; Tabela 1; Figura 12). Na análise entre grupos, observou-se uma diferença estatisticamente significativa em duas semanas.

Tabela 1. Volume total do enxerto dos grupos grânulos e pasta (TV, mm^3) após 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos como média \pm desvio padrão, ^a $p < 0,05$: análise intragrupo; ^b $p < 0,05$: análise entre grupos.

Tempo	Grupo	TV (mm^3)
2 semanas	Grânulos	$104,8 \pm 20,9^{\text{ab}}$
	Pasta	$133,7 \pm 34,6^{\text{ab}}$
10 semanas	Grânulos	$74,1 \pm 16,0^{\text{a}}$
	Pasta	$88,3 \pm 38,6^{\text{a}}$

Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

Figura 12. Imagens tridimensionais dos seios maxilares contendo ambos os enxertos, realizado por meio do software CTVox® (Bruker, Kontich, Bélgica). Os grupos grânulos (círculo vermelho) e pasta após 2 e 10 semanas de reparo.



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

4.1.2 Volume de tecido mineralizado

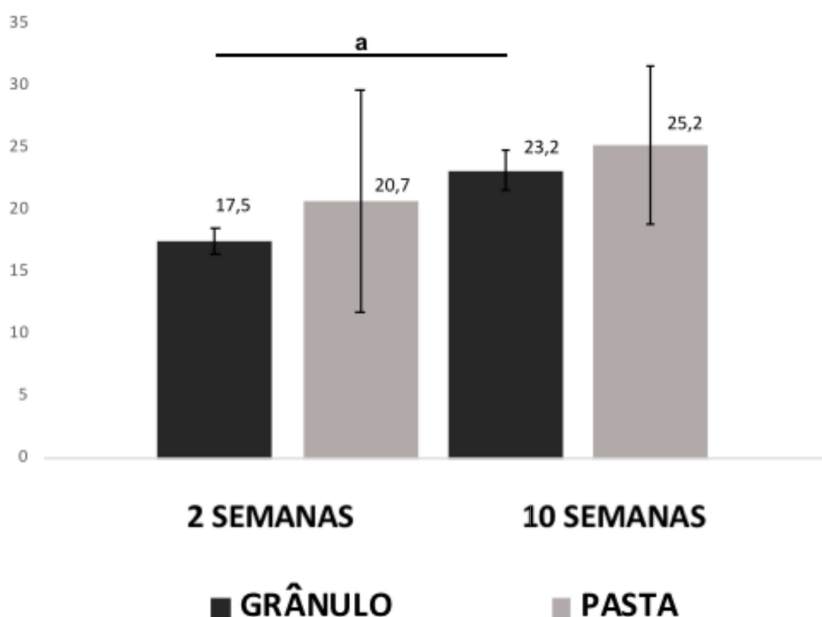
Após 2 e 10 semanas, a quantidade de tecido mineralizado foi de $17,5 \pm 3,2$ mm^3 para $23,2 \pm 1,6$ mm^3 no grupo grânulos ($p < 0,05$); e de $20,7 \pm 9,0$ mm^3 para $25,2 \pm 6,4$ mm^3 no grupo pasta (Tabela 2; Gráfico 1). Quando comparado os grupos entre si, observou-se uma tendência à formação maior de tecido mineralizado no grupo grânulos ao longo do tempo, porém sem diferença estatística.

Tabela 2. Volume de tecido mineralizado em mm^3 (*tresholding* 70 - 100) de ambos os grupos, após 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos como média \pm desvio padrão, ^a $p < 0,05$: análise intragrupo; ^b $p < 0,05$: análise entre grupos.

Tecido mineralizado (<i>tresholding</i> 70 - 100)		
	Grânulos	Pasta
2 semanas	$17,5 \pm 3,2^a$	$20,7 \pm 9,0$
10 semanas	$23,2 \pm 1,6^a$	$25,2 \pm 6,4$

Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

Gráfico 1. Avaliação microtomográfica com porcentagens comparativas de tecido mineralizado de ambos os grupos, em 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos com média \pm desvio padrão, ^a $p < 0,05$: análise intragrupo; ^b $p < 0,05$: análise entre grupos.



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

4.1.3 Volume de enxerto ósseo residual

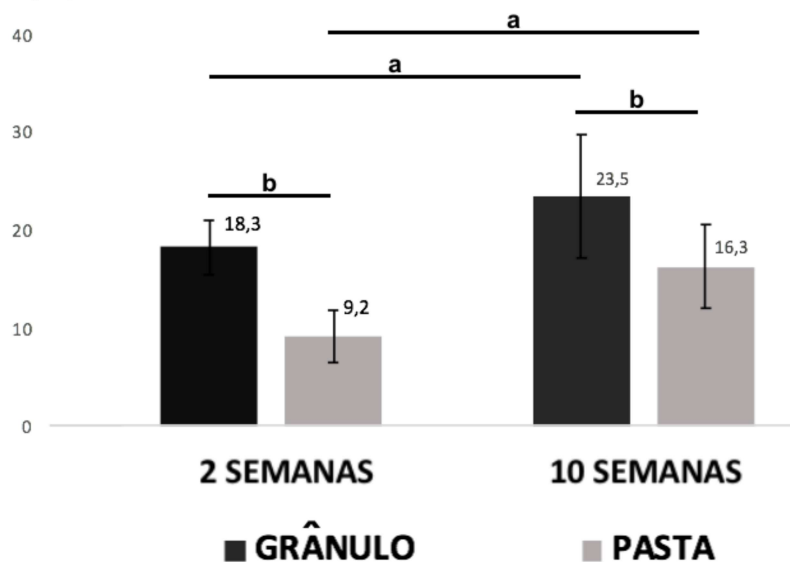
A quantidade de enxerto residual no grupo grânulos foi de $18,3 \pm 2,8 \text{ mm}^3$ para $23,5 \pm 6,3 \text{ mm}^3$; e de $9,2 \pm 2,6 \text{ mm}^3$ para $16,3 \pm 4,3 \text{ mm}^3$ no grupo pasta, após 2 e 10 semanas ($p < 0,05$). Na análise entre grupos, observou-se uma maior quantidade de enxerto residual no grupo grânulos após 2 e 10 semanas de reparo ($p < 0,05$), conforme observado na Tabela 3 e Gráfico 2.

Tabela 3. Volume de enxerto ósseo residual em mm^3 (*tresholding* 100 - 255) após 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos como média \pm desvio padrão, ^a $p < 0,05$: análise intragrupo; ^b $p < 0,05$: análise entre grupos.

Enxerto residual (<i>tresholding</i> 100 - 255)		
	Grânulos	Pasta
2 semanas	$18,3 \pm 2,8^{ab}$	$9,2 \pm 2,6^{ab}$
10 semanas	$23,5 \pm 6,3^{ab}$	$16,3 \pm 4,3^{ab}$

Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

Gráfico 2. Avaliação microtomográfica com porcentagens comparativas de osso novo em 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos como média \pm desvio padrão, ^a $p < 0,05$: análise intragrupo; ^b $p < 0,05$: análise entre grupos.



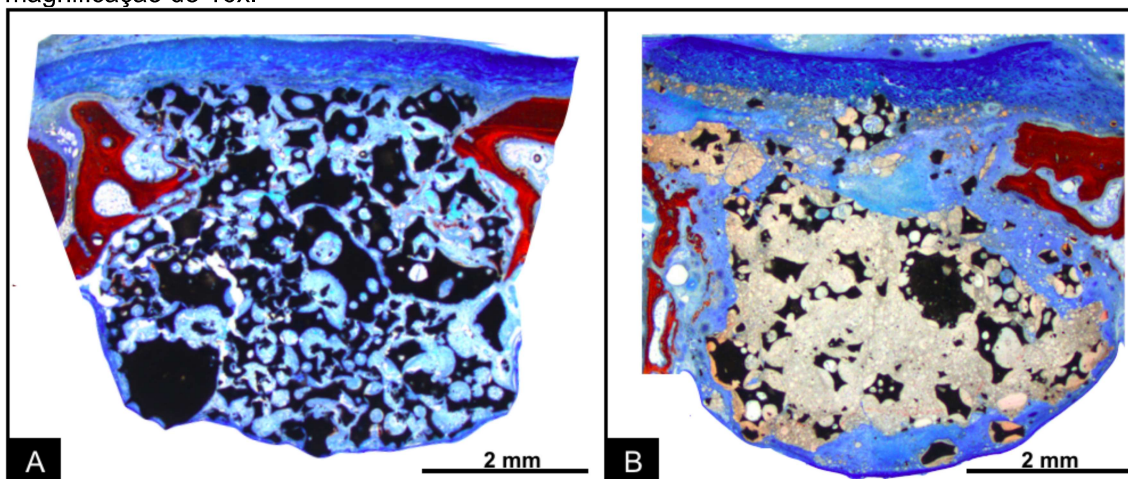
Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

4.2 Avaliação histológica descritiva

No período de 2 semanas de reparo, a área dos seios maxilares levantados apresentava contorno uniforme e integridade da membrana sinusal. A membrana de colágeno estava posicionada na região das antrostomias, em ambos os grupos (Figura 13).

No grupo grânulos, observou-se na área enxertada uma grande quantidade de partículas de biomaterial de tamanho variado e formato irregular, circundada por tecido conjuntivo, como observado na Figura 13A. No grupo pasta, observou-se uma menor quantidade de partículas de biomaterial de tamanho variado e formato irregular. Os espaços entre as partículas estavam preenchidos com pasta envolta de uma grande quantidade de tecido conjuntivo (Figura 13B).

Figura 13. Fotomicrografia histológica de dois seios maxilares elevados, (A) grupo grânulos e (B) grupo pasta no período de 2 semanas. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 16x.



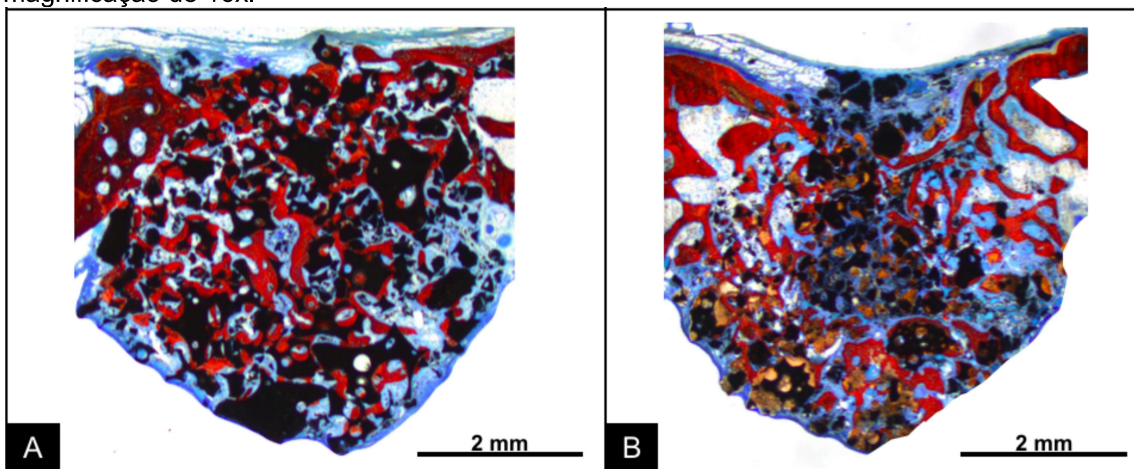
Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

Em 10 semanas de reparo, observou-se que o contorno uniforme da região enxertada permaneceu e que a integridade da membrana sinusal foi mantida. As membranas de colágeno encontravam-se reabsorvidas, sendo possível identificar apenas remanescentes de sua constituição original.

No grupo grânulos, observou-se um fechamento completo e mais regular da antrostomia por meio da formação de osso entre os limites da janela óssea, quando comparado ao grupo pasta. Notou-se ainda grande quantidade de biomaterial, porém os espaços entre as partículas estavam preenchidos por tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo vascularizado (Figura 14A).

No grupo pasta, notou-se um fechamento irregular da antrostomia com tecido ósseo neoformado. A formação de osso novo ocorreu principalmente das regiões das paredes medial e lateral em direção ao centro do enxerto. As partículas não apresentaram grande sinais de absorção, ocupando parte da área enxertada. Por outro lado, a pasta é possível visualizar em pequena quantidade, devido a grande absorção (Figura 14B).

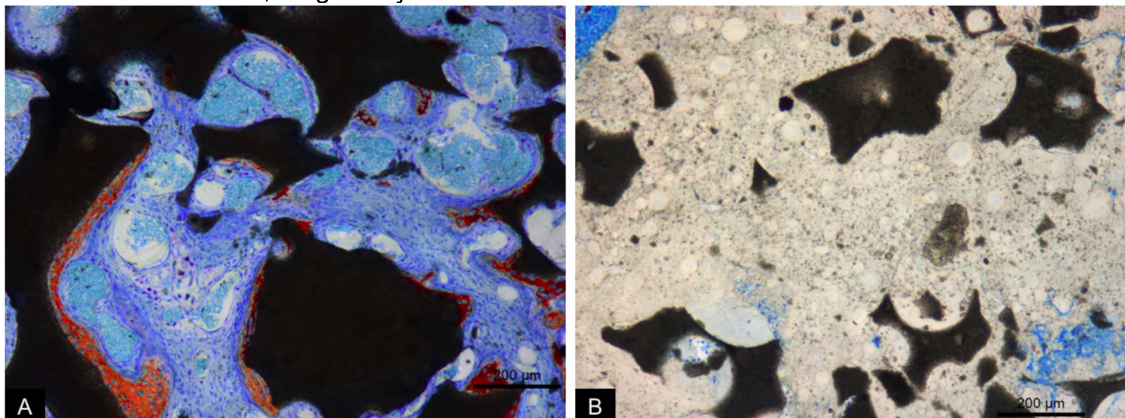
Figura 14. Fotomicrografia histológica de dois seios maxilares elevados, **(A)** grupo grânulos e **(B)** grupo pasta no período de 10 semanas. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 16x.



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

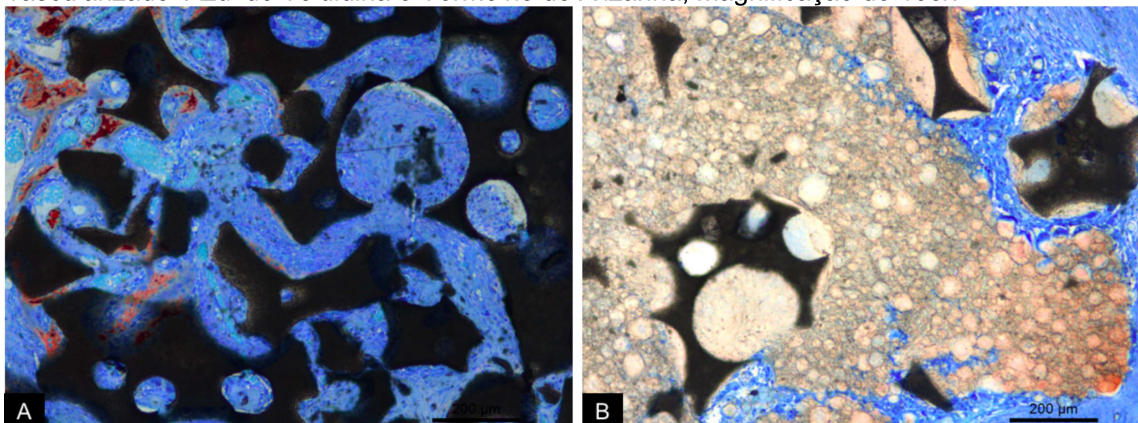
Nas regiões próximo às paredes lateral e medial, no período de 2 semanas, foi observado no grupo grânulos grande quantidade de partículas de biomaterial circundada por tecido conjuntivo ricamente vascularizado. Na superfície das partículas de biomaterial, observou-se a formação de uma fina camada de tecido ósseo imaturo e a presença osteoblastos, conforme é possível visualizar nas Figuras 15A e 16A. No grupo pasta, observou-se uma grande quantidade de gel à base de água contendo partículas de menor diâmetro do biomaterial e nanopartículas de HA, e envolta por tecido conjuntivo vascularizado, em menor quantidade. Não foi possível observar osso novo (Figura 15B e 16B).

Figura 15. Fotomicrografia histológica da região lateral do enxerto em ambos os grupos com 2 semanas de reparo. Observa-se no grupo grânulos (A) neoformação óssea e os espaços entre as partículas preenchidos por tecido conjuntivo vascularizado. No grupo pasta (B), notou-se partículas de menor diâmetro e a presença do gel a base de água. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 100x.



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

Figura 16. Fotomicrografia histológica da região medial do enxerto em ambos os grupos com 2 semanas de reparo. Observa-se no grupo grânulos (A) neoformação óssea e os espaços entre as partículas preenchidos por tecido conjuntivo vascularizado. No grupo pasta (B), notou-se partículas de menor diâmetro e a presença da pasta envolta por tecido conjuntivo vascularizado. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 100x.



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

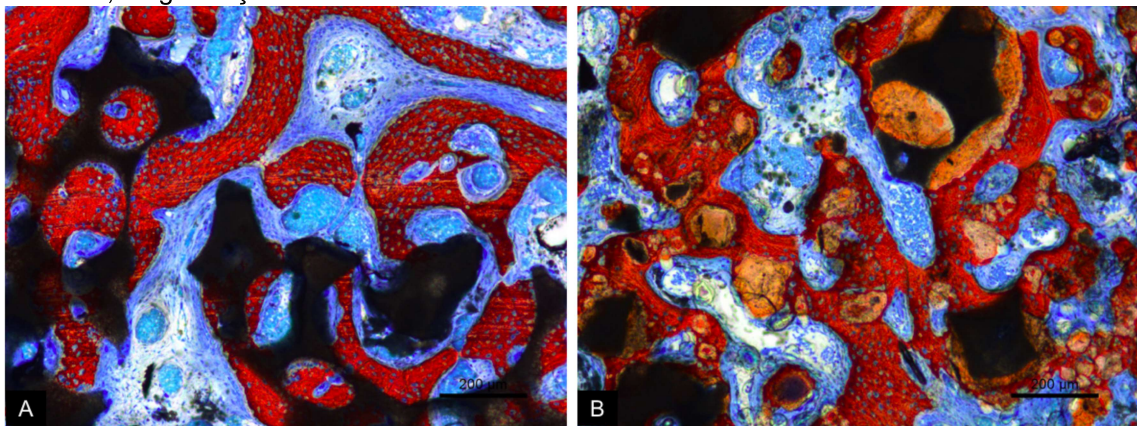
Nas regiões próximas às paredes lateral e medial, no período de 10 semanas, observa-se maturação do tecido neoformado, porém com poucas lacunas osteocíticas, em ambos os grupos (Figuras 17 e 18).

No grupo grânulos, grande quantidade de partículas do biomaterial foi observado, porém os espaços entre as partículas estavam preenchidos por tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo vascularizado. Pequenas áreas absorção do enxerto foram observadas na superfície do biomaterial com a presença de osteoclastos (Figuras 17A e 18A).

No grupo pasta, observou-se presença de partículas do biomaterial e uma diminuição expressiva da quantidade de pasta, sendo possível visualizar

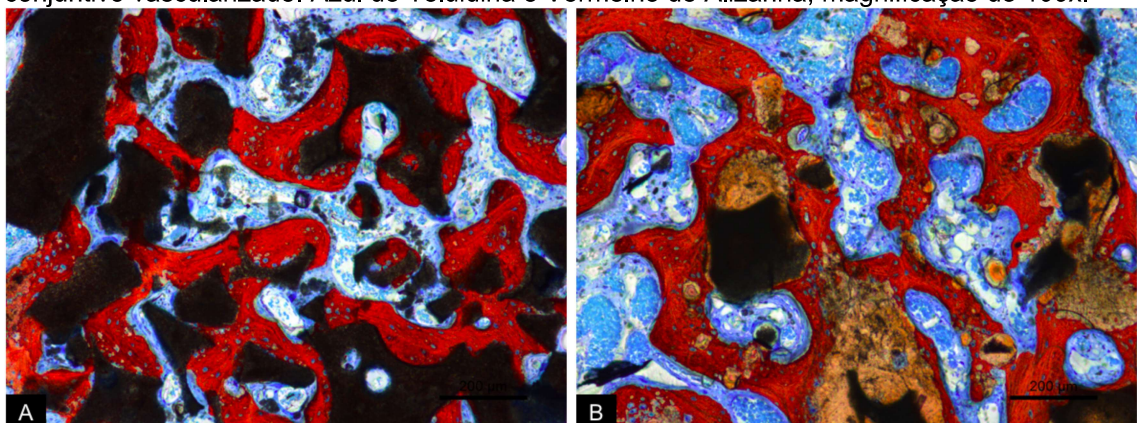
remanescentes de pasta. Os espaços entre as partículas e a pasta estavam preenchidos com tecido ósseo maduro e tecido conjuntivo ricamente vascularizado. Áreas de absorção do enxerto ósseo com a presença de osteoclastos foram observadas na superfície do biomaterial (Figuras 17B e 18B).

Figura 17. Fotomicrografia histológica da região lateral do enxerto em ambos os grupos com 10 semanas de reparo. Observa-se no grupo grânulos **(A)** partículas do biomaterial e os espaços entre as partículas foram preenchidos por tecido ósseo maduro e tecido conjuntivo vascularizado. No grupo pasta **(B)**, notou-se partículas do biomaterial e uma diminuição expressiva da quantidade de pasta. Os espaços entre as partículas e a pasta estavam preenchidos com osso novo e tecido conjuntivo vascularizado. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 100x.



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

Figura 18. Fotomicrografia histológica da região mais próxima da parede medial, em ambos os grupos com 10 semanas de reparo. No grupo grânulos **(A)**, observa-se grandes quantidades de partículas do biomaterial e os espaços entre as partículas foram preenchidos por tecido ósseo maduro e tecido conjuntivo vascularizado. No grupo pasta **(B)**, notou-se poucas partículas do biomaterial e uma diminuição expressiva da quantidade de pasta. Os espaços entre as partículas e a pasta estavam preenchidos com tecido ósseo maduro e tecido conjuntivo vascularizado. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 100x.



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

4.3 Avaliação histomorfométrica

4.3.1 Avaliação de osso novo

Os resultados histomorfométricos mostraram um aumento significativo da quantidade de osso novo ao longo do tempo para ambos os grupos, como ilustrado pela Tabela 4. Entre 2 e 10 semanas, o grupo grânulos aumentou de $1,96 \pm 1,35\%$ para $36,8 \pm 11,7\%$; e o grupo pasta de $0,08 \pm 0,12\%$ para $25,6 \pm 7,6\%$ ($p < 0,05$).

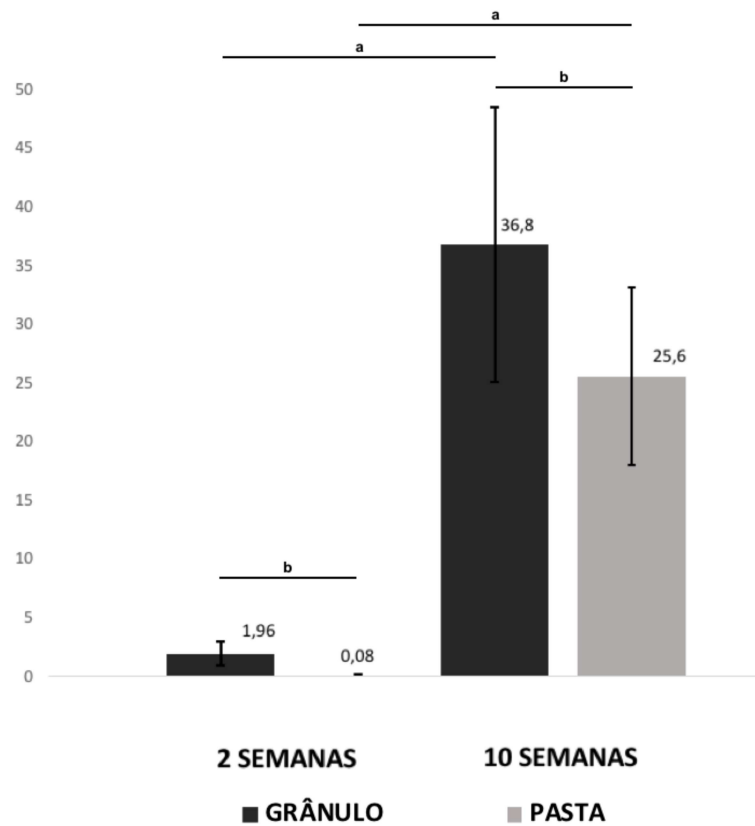
A análise intergrupos evidenciou uma maior porcentagem de osso novo no grupo grânulos em 2 semanas ($p < 0,05$). Por outro lado, em 10 semanas, houve uma discrepância menor entre as formulações, com uma diferença de apenas 1,4 vezes para o grupo grânulos ($p < 0,05$; Tabela 4; Gráfico 3).

Tabela 4. Média e desvio padrão de análise histomorfométrica de neoformação óssea dos grupos grânulos e pasta, em 2 e 10 semanas. Valores expressos como média \pm desvio padrão, ^a $p < 0,05$: análise intragrupo; ^b $p < 0,05$: análise entre grupos.

	Osso novo (%)	
	Grânulos	Pasta
2 semanas	$1,96 \pm 1,35^{ab}$	$0,08 \pm 0,12^{ab}$
10 semanas	$36,8 \pm 11,7^{ab}$	$25,6 \pm 7,6^{ab}$

Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

Gráfico 3. Avaliação histomorfométrica com porcentagem comparativas de osso novo em 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos como média \pm desvio padrão, ^a $p < 0,05$: análise intragrupo; ^b $p < 0,05$: análise entre grupos.



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

Para o grupo grânulos, em 2 semanas, as porcentagens de osso novo nas regiões das paredes ósseas e do centro do enxerto foi de $3,5 \pm 2,1\%$ e $0,4 \pm 1,0\%$ ($p < 0,05$); e de $39,8 \pm 12,6\%$ e $36,6 \pm 8,2\%$ em 10 semanas ($p > 0,05$; Tabela 5).

Para o grupo pasta, em 2 semanas, observou-se formação de osso novo apenas nas regiões das paredes ósseas de $0,1 \pm 0,3\%$. Em 10 semanas, as porcentagens de osso novo nas paredes ósseas e do centro foi de $35,0 \pm 7,6\%$ e $16,0 \pm 10,1\%$ ($p < 0,05$), conforme Tabela 5.

Tabela 5. Porcentagem de neoformação óssea dos grupos grânulos e pasta, através da análise histomorfométrica da média das regiões próximas as paredes ósseas (parede lateral + parede medial) e da região central do enxerto, em 2 e 10 semanas. Valores expressos como média \pm desvio padrão, ^a $p < 0,05$.

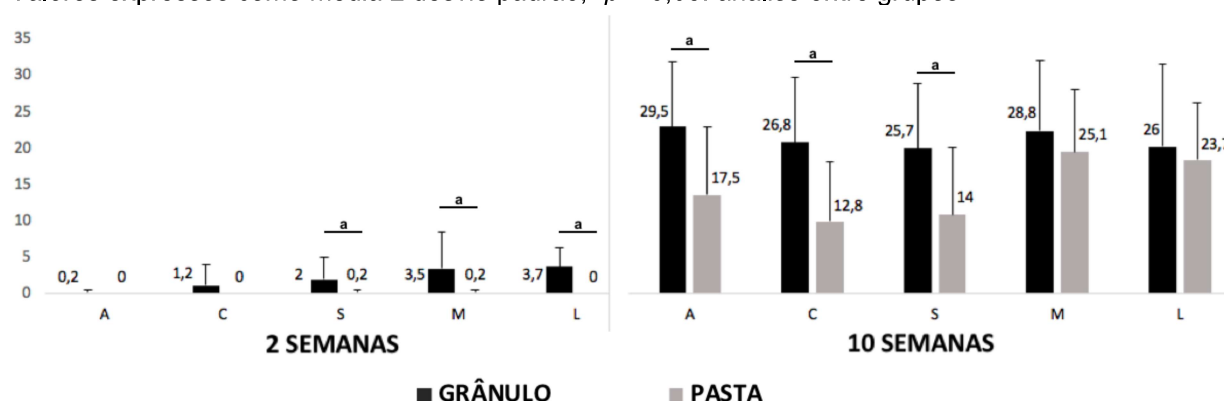
	Osso novo			
	Grânulos		Pasta	
	Paredes ósseas	Centro	Paredes ósseas	Centro
2 semanas	3,5 \pm 2,1 ^a	0,4 \pm 1,0 ^a	0,1 \pm 0,3	0
10 semanas	39,8 \pm 12,6	36,6 \pm 8,2	35,0 \pm 7,6 ^a	16,0 \pm 10,1 ^a

Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

Em 2 semanas, na comparação entre os grupos, observou-se uma maior porcentagem de osso novo no grupo grânulos em todas as regiões analisadas. No entanto, apenas as regiões próximas da membrana sinusal e das paredes lateral e medial apresentaram resultado estatisticamente significativo (Gráfico 4).

Em 10 semanas, o grupo grânulos permaneceu com uma maior porcentagem de osso novo, em todas as áreas analisadas, comparado ao grupo pasta. E as regiões próximas da antrostomia, do centro e da membrana sinusal apresentaram resultado estatisticamente significativo, conforme observado no Gráfico 4.

Gráfico 4. Avaliação histomorfométrica com porcentagem comparativas de osso novo de cada região avaliada (A = Região da antrostomia; C = Região central do enxerto; S = região próxima a membrana sinusal; M = próximo a parede medial e L = próximo a parede lateral), em 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos como média \pm desvio padrão, ^a $p < 0,05$: análise entre grupos.



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

4.3.2 Avaliação de enxerto ósseo residual

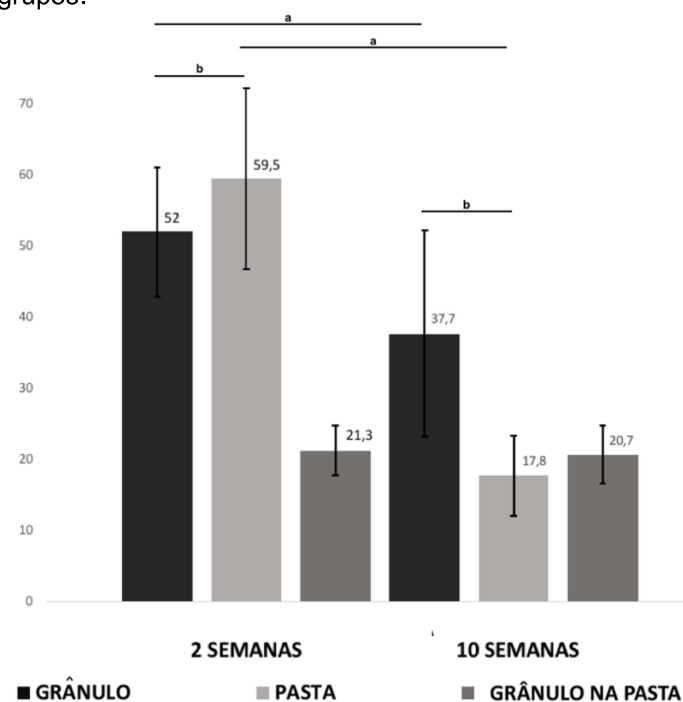
O enxerto residual diminuiu em ambos os grupos após 10 semanas de reparo. A quantidade de enxerto remanescente no grupo grânulos diminuiu de $52,0 \pm 9,0\%$ para $37,7 \pm 14,5\%$; enquanto que a quantidade de pasta, de $59,5 \pm 12,7\%$ para $17,8 \pm 5,65\%$ ($p < 0,05$). Além disso, ao longo dos períodos de 2 e 10 semanas, observou-se uma discreta diminuição dos grânulos presentes na formulação pasta. Entre a quantidade de grânulos e pasta, notou-se uma maior absorção da pasta ($p < 0,05$; Tabela 6; Gráfico 5).

Tabela 6. Média e desvio padrão de análise histomorfométrica de enxerto ósseo residual do grupo grânulos, pasta e grânulos contidos na pasta, em 2 e 10 semanas. Valores expressos como média \pm desvio padrão, ^a $p < 0,05$: análise intragrupo; ^b $p < 0,05$: análise entre grupos.

	Enxerto residual (%)		
	Grânulos	Pasta	Grânulos na pasta
2 semanas	$52,0 \pm 9,0^{ab}$	$59,5 \pm 12,7^{ab}$	$21,3 \pm 3,5$
10 semanas	$37,7 \pm 14,5^{ab}$	$17,8 \pm 5,65^{ab}$	$20,7 \pm 4,1$

Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

Gráfico 5. Avaliação histomorfométrica com porcentagens comparativas de enxerto ósseo residual contidos no grupo grânulos, de pasta e quantidade de grânulos presentes na pasta, em 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos como média \pm desvio padrão, ^a $p < 0,05$: análise intragrupo; ^b $p < 0,05$: análise entre grupos.



Fonte: Costa, Silva, Xavier (2020).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo comparar o comportamento histomorfométrico e microtomográfico de duas formulações (i.e., grânulos e pasta) de um enxerto aloplástico composto por uma combinação entre beta-fosfato tricálcio e hidroxiapatita em cirurgias de levantamento de seio maxilar em coelhos. O modelo experimental em coelhos utilizado neste estudo permite a avaliação da incorporação e neoformação ósseas dos enxertos, com vista a estabelecer um paralelo com o que ocorre nesses processos em humanos. Adicionalmente, por se tratar de um modelo do tipo boca dividida, as possíveis interferências entre indivíduos foram reduzidas ao mínimo aceitável. Essa metodologia vem sendo empregada em trabalhos publicados recentemente pelo mesmo grupo de pesquisa.

As técnicas de reconstrução óssea foram desenvolvidas para otimizar o resultado estético-funcional das reabilitações orais implanto-suportadas. Diversos estudos apresentam resultados satisfatórios em termos de sobrevivência de implantes e manutenção volumétrica do enxerto a longo prazo, em seios maxilares reconstruídos com enxerto ósseo sintético à base de fosfato de cálcio bifásico. (LEGEROS, *et al.*, 2003; LINDGREN, MORDENFELD, HALLMAN, 2012; MORDENFELD, LINDGREN, HALLMAN, 2016; CORBELLA *et al.*, 2016).

Esse biomaterial é composto pela associação de hidroxiapatita (HA) de lenta reabsorção com o fosfato beta-tricálcico (β -TCP) de rápida reabsorção, facilitando a migração de células osteoprogenitoras e contribuindo para a formação de osso novo (CHIAPASCO *et al.*, 2008; MANGANO *et al.*, 2013; OHAYON, 2014; DUTTA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017). No presente estudo, utilizou-se o biomaterial Maxresorb® na proporção de 60HA e 40de β -TCP na forma de grânulos ou pasta. Jelusic *et al.* (2017), por meio de um estudo clínico prospectivo randomizado utilizando o mesmo biomaterial em grânulos, demonstraram bons resultados em relação a neoformação óssea e incorporação do enxerto. Todavia, não há, até o presente momento, estudos clínicos e/ou experimentais avaliando o comportamento biológico da formulação em pasta do Maxresorb®.

Do ponto de vista clínico, o biomaterial em pasta injetável apresenta alguns diferenciais, tais como a diminuição do tempo operatório, facilidade de manuseio e melhor adaptação ao leito receptor (SOHN *et al.*, 2009) Por esse motivo, este estudo

será o primeiro a comparar as duas formulações do Maxresorb® histológica e microtomograficamente.

A avaliação microtomográfica proposta neste estudo visou investigar tridimensionalmente as variações volumétricas dos seios maxilares enxertados com Maxresorb® em grânulos ou pasta, por meio da análise do volume total do enxerto, quantidade de tecido mineralizado neoformado e enxerto remanescente em dois tempos experimentais (i.e., 2 e 10 semanas). Entretanto, constatou-se dificuldade na determinação da escala de cinza (*thresholding*) que diferenciasse com exatidão osso novo de enxerto remanescente. Essa mesma limitação com relação à análise microtomográfica de enxertos em seio maxilar de coelhos foi recentemente descrita por outros autores (OMORI et al., 2018; IIDA et al. 2020). No presente estudo, para efeito de padronização e comparação, determinou-se duas escalas de cinza (*thresholding*), uma para avaliação do tecido mineralizado (*thresholding* 70 - 100, mm³) e outra para enxerto ósseo residual (*thresholding* 100 - 255, mm³), conforme proposto por Lida et al. (2020).

Os resultados microtomográficos deste trabalho mostraram uma superioridade do grupo grânulos em relação à manutenção volumétrica do enxerto ao longo do tempo. O volume total do enxerto apresentou uma redução de 29,5% para grupo grânulos e de 33,9% para o grupo pasta ao final de 10 semanas. Esse resultado pode estar associado à presença de uma maior quantidade de enxerto remanescente no grupo grânulos, principalmente pelo fato de o gel à base de água ter sido reabsorvido. Lim et al. (2015), em um estudo randomizado em cirurgias de levantamento de seio maxilar em coelhos, avaliaram microtomograficamente o enxerto fosfato de cálcio bifásico Osteon® em grânulos em diferentes proporções (70HA / 30β-TCP e 30HA / 70β-TCP). Esses autores observaram uma contração volumétrica de 18,5% e 19,5% respectivamente para as proporções analisadas, após um período de 8 semanas. Entretanto, a diferença observada entre os estudos pode estar relacionada aos períodos experimentais avaliados.

No que se refere ao tecido mineralizado neoformado, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos grânulos e pasta em 2 e 10 semanas. No entanto, parece haver uma tendência de maior formação de tecido mineralizado no grupo grânulos em 10 semanas (grânulos: $17,5 \pm 3,2$ para $23,2 \pm 1,6$ mm³ vs pasta: $20,7 \pm 9,0$ para $25,2 \pm 6,4$ mm³, em 2 e 10 semanas respectivamente). Lim et al. (2016), em um estudo utilizando metodologia

semelhante à deste estudo, observaram uma maior quantidade de tecido mineralizado após 8 semanas de reparo em seios maxilares enxertados com Osteon® em grânulos em diferentes proporções (70HA / 30 β -TCP: $56,9 \pm 9,9 \text{ mm}^3$ e 30HA / 70 β -TCP: $65,9 \pm 13,0 \text{ mm}^3$). Essa superioridade pode ser explicada pela utilização de uma quantidade inicial maior de enxerto ósseo ($\sim 200 \text{ mm}^3$) e pela diferença de *thresholding* empregada entre os estudos.

Em humanos, OH *et al.*, 2019, em estudo prospectivo, avaliaram microtomograficamente a quantidade de tecido mineralizado neoformado em seios maxilares enxertados com osso bovino mineral ou um material aloplástico à base de HA e β -TCP. Após um período de avaliação de 6 meses, foi observado $35,2 \pm 6,9 \text{ mm}^3$ de tecido mineralizado para o enxerto Osteon® (60HA / 40 β -TCP) e $31,6 \pm 8,2 \text{ mm}^3$ para o Bio-Oss®.

O presente estudo revelou um aumento da porcentagem de enxerto ósseo residual de 28,4% e 77,0% para os grupos grânulos e pasta respectivamente, após 10 semanas. Esse aumento da quantidade de enxerto remanescente no grupo grânulos corrobora com os achados de Iida *et al.* (2020), no qual também observou-se um aumento de 28,9% após 8 semanas. Este fato pode estar relacionado mais uma vez à dificuldade de se diferenciar o osso recém-formado do biomaterial pré-existente.

Na análise histológica, foi possível observar uma discreta neoformação óssea após 2 semanas de reparo, localizado nas proximidades das paredes ósseas do seio maxilar, no grupo grânulos. Por outro lado, no grupo pasta não foi encontrado neoformação óssea, sendo observado uma grande quantidade de enxerto ósseo remanescente. Além disso, notou-se uma maior quantidade de vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório no grupo grânulos. Masuda *et al.* (2019) em um estudo realizado em seios maxilares de coelhos, também relataram uma pequena quantidade de osso novo formando-se a partir das paredes ósseas do seio maxilar após 2 semanas de reparo.

No período de 10 semanas, observou-se um aumento da quantidade de tecido ósseo neoformado em comparação ao período anterior em todas as regiões analisadas. Além disso, notou-se um contato íntimo entre o osso neoformado e as partículas do biomaterial, em ambos os grupos. Lambert *et al.* (2013), em um estudo comparativo entre Bio-Oss® e um enxerto à base de fosfato de cálcio bifásico (60HA

/ 40 β -TCP) em seios maxilares de coelhos, observaram resultados histológicos semelhantes ao deste estudo, porém após um período de avaliação de 5 semanas.

Com isso, notou-se que o biomaterial Maxresorb® na sua formulação em grânulos apresentou uma formação de osso novo adequada, pela reabsorção controlada do enxerto remanescente e manutenção de parte das partículas do enxerto. No entanto, observou-se que o gel aquoso contido na formulação em pasta injetável foi gradualmente substituído por osso novo e as partículas de biomaterial foram reabsorvidas mais lentamente.

A utilização da membrana de colágeno para recobrir as antrostomias garantiu os princípios da regeneração óssea guiada, sendo visualizada integralmente em 2 semanas. No final da décima semana, observou-se reabsorção quase completa da membrana de colágeno em ambos os grupos, corroborando os resultados encontrados por outros autores recentemente (CHOI *et al.*, 2009; SCALA *et al.*, 2016; JUNG *et al.*, 2017; MASUDA *et al.*, 2019). Adicionalmente, notou-se fechamento das antrostomias com tecido ósseo neoformado na maioria das amostras analisadas, em ambos os grupos. O grupo grânulos apresentou um melhor fechamento, com formação óssea mais regular e uniforme. Por outro lado, no grupo pasta, observou-se um fechamento irregular, caracterizado pela formação de uma depressão óssea na região das antrostomias. Esses achados vão ao encontro dos obtidos por Masuda *et al.* (2019), que observaram esse fechamento das antrostomias após um período de oito semanas.

No presente estudo, após análise histomorfométrica, foi possível observar diferença estatística entre os grupos grânulos e pasta no que se refere à quantidade de osso novo, com superioridade do grupo grânulos em ambos os períodos avaliados. Em 10 semanas de reparo a porcentagem de osso novo no grupo grânulos foi de $36,8 \pm 11,7\%$ e $25,6 \pm 7,6\%$ no grupo pasta. Lambert *et al.* (2013) observaram uma maior neoformação óssea no grupo fosfato de cálcio bifásico ($16,0 \pm 3,7\%$ vs $21,5 \pm 3,8\%$, respectivamente) após um período de avaliação mais prolongado (i.e. 6 meses). Em outro estudo, Lim *et al.* (2015) observaram que o biomaterial na proporção de 70HA / 30 β -TCP apresentou $22,0 \pm 2,28\%$ de osso novo após 8 semanas; na proporção de 30HA / 70 β -TCP, a quantidade de osso novo foi de $21,1 \pm 4,8\%$. Com isso, notou-se uma superioridade do enxerto Maxresorb® do ponto de vista de neoformação óssea.

Corbella *et al.* (2016), por meio de uma revisão sistemática e metanálise, avaliaram o comportamento histomorfométrico de diferentes substitutos ósseos utilizados em cirurgia de levantamento de seio maxilar. Esses autores observaram, na comparação entre enxerto ósseo bovino e a associação de HA + β -TCP, uma maior quantidade de osso novo para o material aloplástico. Em um estudo clínico prospectivo, Jelusic *et al.* (2017) compararam histomorfometricamente os enxertos beta fosfato tricálcio monofásico (100% β -TCP, Bioresorb®) e a associação de HA + β -TCP (na proporção de 60:40, Maxresorb®), ambos na formulação de grânulos, em cirurgias de levantamento de seio maxilar. No pós-operatório de 6 meses, observou-se uma maior neoformação óssea (38,42%) no grupo de pacientes que utilizaram a associação de HA + β -TCP. Essa porcentagem de osso novo observada aproximou-se da observada no presente estudo após 10 semanas de avaliação. Em contrapartida, outro estudo clínico utilizando o enxerto Osteon® na mesma proporção (60:40) observou uma porcentagem de osso novo (28,8%) inferior após 6 meses (OH, J. *et al.*, 2019).

A semelhança do que ocorre no presente estudo, estudos clínicos e experimentais mostram que a formação de osso novo ocorre inicialmente próxima das regiões das paredes ósseas ou margens da antrostomia prosseguindo em direção ao centro da área enxertada (SCALA *et al.*, 2016; OMORI *et al.*, 2018; TANAKA *et al.*, 2019).

Com relação à reabsorção do enxerto ósseo remanescente, foi observado uma maior quantidade total de enxerto para o grupo pasta em ambos os períodos avaliados, sendo que, neste grupo, a reabsorção se deu fundamentalmente às custas da degradação do gel à base de água. Até o momento, não há estudos sobre a taxa de reabsorção do beta fosfato tricálcico em pasta que nos sirvam como objeto de comparação.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

- As formulações em grânulos e pasta do enxerto Maxresorb[®] mostraram resultados favoráveis à incorporação, com formação de osso novo em quantidade e qualidade. Do ponto de vista de formação de neoformação óssea, o grupo grânulos apresentou superioridade quando comparado ao grupo pasta, em todas as análises.
- Ambos os grupos apresentaram uma contração volumétrica e reabsorção do enxerto ao longo do tempo.
- A neoformação óssea ocorreu a partir das paredes ósseas progredindo em direção ao centro dos seios maxilares, em ambos os grupos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLMANN, E. *et al.* Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. **J Bone Joint Surg Am**, v. 84, n.5, p. 716-720, 2002.
- ARAUJO, M. G.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 2, p. 212-218, 2005.
- CAMPANA, V. *et al.* Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. **J Mater Sci Mater Med**, v. 25, n. 10, p. 2445-2461, 2014.
- CHOI, K.S. *et al.* Effects of resorbable membrane on human maxillary sinus graft: a pilot study. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 24, n.1, p. 73– 80, 2009.
- CORBELLA, S.; TASCHIERI S.; WEINSTEIN R.; FABBRO M. D. Histomorphometric outcomes after lateral sinus floor elevation procedure: a systematic review of the literature and meta-analysis. **Clin Oral Implants Res**, v.27, n.9, p. 11106-1122, 2016.
- CHIAPASCO, M. *et al.* Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. **Clin Oral Implants Res**.v.19, n.8, p. 796-803, 2008.
- DAWSON III, R.D.; EL-GHANNAM. A.; VAN SICKELS, J.E.; NAUNG, N.Y. Tissue Engineering: What is New? **Dent Clin North Am**, v.63, n.3, p. 433-445, 2019.
- DEL FABBRO, M.; WALLACE, S.S.; TESTORI, T. Long-term implant survival in the grafted maxillary sinus: a systematic review. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 33, n. 6, p. 773-783, 2013.
- DELGADO-RUIZ, R.A.; CALVO GUIRADO, J.L.; ROMANOS, G. E. Bone grafting materials in critical defects in rabbit calvariae. A systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. **Clin Oral Implants Res**, v.29, n.6, p. 620-634, 2018.
- DONOS, N.; MARDAS, N., CHADHA, V. Clinical outcomes of implants following lateral bone augmentation: systematic assessment of available options (barrier membranes, bone grafts, split osteotomy). **J Clin Periodontol**, v.35. p. 173-202, 2008.
- DUTTA, S. R.; PASSI, D.; SINGH, P. Ceramic and non-ceramic hydroxyapatite as a bone graft material: a brief review. **Ir J Med Sci**, v. 184, n. 1, p. 101-106, 2015.
- FARIÑA, N. M.; GUZÓN, F.M.; PEÑA, M.L.; CANTALAPIEDRA A.G. In vivo behaviour of two different biphasic ceramic implanted in mandibular bone of dogs. **J Mater Sci Mater Med**, v. 19, n. 4, p. 1565-1573, 2008.
- GAMRADT, S.C.; LIEBERMAN, J. R. Bone graft for revision hip arthroplasty: Biology and future applications. **Clin Orthop Relat Res**, v. 417, p. 183-194, 2003.

IIDA, T. *et al.* Influence of a collagen membrane positioned subjacent the sinus mucosa following the elevation of the maxillary sinus. A histomorphometric study in rabbits. **Clin Oral Implants Res**, v. 28, n. 12, p. 1567-1576, 2017.

IIDA, T. *et al.* Comparison of histomorphometry and microCT after sinus augmentation using xenografts of different particle sizes in rabbits. **Oral Maxillofac Surg**, v. 24, n. 1, p. 57-64, 2020.

INTINI, G. *et al.* A comparative analysis of bone formation induced by human demineralized freeze-dried bone and enamel matrix derivative in rat calvaria critical-size bone defects. **Journal Periontol**, v. 79, n. 4, p. 1217-1224, 2008.

JELUSIC, D. *et al.* Monophasic B-TCP vs. biphasic HA/B-TCP in two-stage sinus floor augmentation procedures – a prospective randomized clinical trial. **Clin Oral Implants Res**, v. 28, n.10, p. e175-e183, 2017.

JENSEN, S. S.; TERHEYDEN, H. Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: Clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24, p. 218-236, 2009.

JUNG, U. W. *et al.* Simultaneous lateral bone augmentation and implant placement using a particulated synthetic bone substitute around chronic peri-implant dehiscence defects in dogs. **Clin Periodontol**, v. 44, n. 11, p.1172-1180, 2017.

KIM, Y.; RODRIGUEZ, A. E.; NOWZARI, H. The risk of prion infection through bovine grafting materials. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 18, n. 6, p. 1095-1102, 2016.

KIM, Y.; NOWZARI H.; RICH S.K. Risk of prion disease transmission through bovine-derived bone substitutes: a systematic review. **Clin Implant Dent Relat Res**, v.15, n.5, p. 645-653, 2013.

KONERMANN, A. *et al.* Bone substitute material composition and morphology differentially modulate calcium and phosphate release through osteoclast-like cells. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 43, n. 4, p. 514-521, 2014.

LAMBERT, F. *et al.* A comparison of three calcium phosphate-based space fillers in sinus elevation: a study in rabbits. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 28, n. 2, p. 393-402, 2013.

LEGEROS, R. Z. *et al.* Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. **J Mater Sci Mater Med**, v. 14, n. 3, p. 201–209, 2003.

LIM, H. C. *et al.* Effect of different hydroxyapatite: β -tricalcium phosphate ratios on the osteoconductivity of biphasic calcium phosphate in the rabbit sinus model. **Int J Oral Maxillofac Implants**. v. 30, n. 1, p. 65-72, 2015.

LIM, H. C. *et al.* Late-term healing in an augmented sinus with different ratios of biphasic calcium phosphate: a pilot study using a rabbit sinus model. **J Periodontal Implant Sci**, v. 46, n. 1, p. 57-69, 2016.

LINDGREN, C. *et al.* Clinical histology of microimplants placed in two different biomaterials. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24, n. 6, p. 1093–1100, 2009.

LINDGREN, C; MORDENFELD, A; HALLMAN, M. A prospective 1-year clinical and radiographic study of implants placed after maxillary sinus floor augmentation with synthetic biphasic calcium phosphate or deproteinized bovine bone. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 14, n. 1, p. 41-50, 2012.

MANGANO, C. *et al.* Maxillary Sinus Grafting with Biphasic Calcium Phosphate Ceramics: Clinical and Histologic Evaluation in Man. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 28, n.1, p. 51–56, 2013.

MASUDA, K. *et al.* 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 Implants**, v. 34, n. 4, p. 819–827, 2019.

Maxresorb inject – Four-phasic injectable bone graft. Disponível em: <<https://botiss-dental.com/products/maxresorb-inject/>>. Acesso em: 20 jul. 2020.

MORDENFELD, A.; LINDGREN, C.; HALLMAN, M. Sinus Floor Augmentation Using Straumann® BoneCeramic™ and Bio-Oss® in a Split Mouth Design and Later Placement of Implants: A 5-Year Report from a Longitudinal Study. **Clinical Implant Dentistry & Related Research**, v. 18, n.5, 2016.

OH, J. *et al.* A Comparative Study with Biphasic Calcium Phosphate to Deproteinized Bovine Bone in Maxillary Sinus Augmentation: A Prospective Randomized and Controlled Clinical Trial. **Int. J. Oral Maxillofac**, v. 1, n. 34, p. 233-242, 2019.

OHAYON, L. Maxillary Sinus Floor Augmentation Using Biphasic Calcium Phosphate: A histologic and Histomorphometric Study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 29, n. 5, p. 1143–1148, 2014.

OHSAWA, K.; NEO, M.; MATSUOKA, H. The expression of bone matrix protein mRNA around beta-TCP particles implanted into bone. **J Biomed Mater Res**, v. 52, n. 3, p. 460-466, 2000.

OMORI, Y. *et al.* Reposition of the bone plate over the antrostomy in maxillary sinus augmentation: A histomorphometric study in rabbits. **Clin Oral Implants Res**, v. 29, n.8, p. 821-834, 2018.

PARK, S.Y. *et al.* The evaluation of the correlation between histomorphometric analysis and micro-computed tomography analysis in AdBMP-2 induced bone regeneration in rat calvarial defects. **J Periodontal Implant Sci**, v.41, n.5, p. 218–226, 2011.

SAKKAS, A. *et al.* Autogenous bone grafts in oral implantology – it is still a “gold standard”? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. **Int J Implant Dent**, v.3, n.23, p. 1-17, 2017.

SCHAEFER S. *et al.* How degradation of calcium phosphate bone substitute materials is influenced by phase composition and porosity. **Adv Eng Mater**, v. 13, n. 4, p. 342-350, 2011.

SOHN, D. S. *et al.* Histomorphometric evaluation of mineralized cancellous allograft in the maxillary sinus augmentation: a 4 case report. **Implant Dent**, v. 18, n. 2, p. 172-181, 2009.

SOHN D. S. Efficacy of demineralized bone matrix paste for maxillary sinus augmentation: a histologic and clinical study in humans. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.108, n. 5, p. 30-35, 2009.

SCALA, A.; LANG, N.P.; VELEZ, J.U. Effects of a collagen membrane positioned between augmentation material and the sinus mucosa in the elevation of the maxillary sinus floor. An experimental study in sheep. **Clin Oral Implants Res**. v. 27, p. 1454–1461. 2016.

TANAKA, K.; IEZZI, G.; PIATTELLI, A. Sinus Floor Elevation and Antrotomy Healing: A Histomorphometric Clinical Study in Humans. **Implant Dent**. v. 28, n. 6, p. 537-542, 2019.

WALLACE, S. S.; FROUM, S. J. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. **Ann Periodontol**, v. 8, n. 1, p. 328-343, 2003.

WANG, Y. *et al.* 3D fabrication and characterization of phosphoric acid scaffold with a HA/beta-TCP weight ratio of 60:40 for bone tissue engineering applications. **PLoS One**, v.12, n. 4, p. 1-17, 2017.

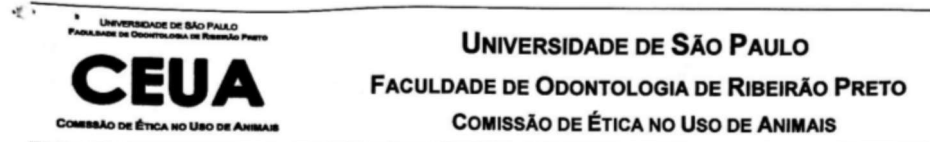
ZIZZARI, V. *et al.* Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. **Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 122, n. 4, 2016.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO I


OFÍCIO DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO CEUA – FORP/USP**

Certificamos que o projeto intitulado “**Comparação entre substituto ósseo aloplástico em grânulos ou pasta em cirurgia de levantamento de seio maxilar. Estudo experimental em coelhos**”, Protocolo nº 2018.1.842.58.2, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Samuel Porfírio Xavier – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 09/01/2019.

Vigência do Projeto	01/02/2019 a 31/01/2020
Espécie/Linhagem	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	20
Peso/Idade	3,5 -4,5 kg / 5-6 meses
Sexo	Machos
Origem	Criadouro – Taquaritinga - SP

Ribeirão Preto, 09 de janeiro de 2019.


Prof. Dr. Michel Reis Messora

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA - FORP/USP

ANEXO II

VERSÃO RESUMIDA EM INGLÊS DO ARTIGO SUBMETIDO

Comparison of alloplastic bone substitute in granules or paste in maxillary sinus augmentation. Experimental study in rabbits

Michael Medeiros Costa, DDS¹

Daniele Botticelli, BMBD, PhD²

Samuel Porfirio Xavier, DDS, PhD³

Erick Ricardo Silva, DDS, PhD⁴

¹Msc student, Department of Oral Maxillofacial Surgery and Periodontology, Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

²ARDEC Academy, Rimini, Italy.

³Assistant Professor, Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology, Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

⁴Post doctoral student, Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil;

Corresponding author:

Erick Ricardo Silva

University of São Paulo

Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology

Av. do Café, S/N, Ribeirão Preto, SP, Brazil, 14040-904

Email: erickricardo.rp@gmail.com

Tel: +55 16 3315 4053

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the sequential repair of maxillary sinuses grafted with granules or paste of an alloplastic bone substitute after maxillary sinus augmentation, through microtomographic, histological and histomorphometric analysis. In that prospective, randomized, split-mouth study, twenty New Zealand male rabbits, with 3.5 - 4.0 kg of weight and 5 - 6 months of age, were used and divided into 2 groups of 10 rabbits each, with euthanasia performed at 2 and 10 weeks, respectively. After the elevation of the sinus membrane, a bone substitute was introduced in granules (Maxresorb®, Botiss Biomaterials, Zossen, Germany) or in paste (Maxresorb® inject, Botiss Biomaterials, Zossen, Germany). Then, a porcine collagen membrane (Bio-Gide®, Geistlich, Wolhusen, Switzerland) was used to cover the antrastomies. After the animals were euthanized, the removed specimens were sent for microtomographic analysis. With the aid of the CTAn® software (Bruker, Kontich, Belgium), the total graft volume (TV, mm³) was measured. For identification of mineralized bone tissue (thresholding 70 -100) and for residual bone graft structures (thresholding 100 - 255). Then, the pieces were processed for histological and histomorphometric evaluation. The resin specimens were prepared using precision cutting / wear equipment (Exakt, Apparatebau, Norderstedt, Germany). And the slides were stained with toluidine blue and alizarine red. For histomorphometric analysis, five different areas of the bone graft were evaluated and the percentages of new bone and residual graft were measured. The data obtained were analyzed statistically by means of ANOVA and Student's t analysis of variance. Microtomographic analyzes showed a volumetric contraction of the biomaterial in both groups over time. Regarding the amount of mineralized tissue, the group of granules went from 17.5 ± 3.2 mm³ to 23.2 ± 1.6 mm³ (p < 0.05) and the paste group was 20.7 ± mm³ to 25.2 ± 6.4 mm³, in 2 and 10 weeks, respectively. When the groups were compared, there was a greater tendency for the formation of mineralized tissue in the granules group over time, but there was no statistical difference. Histomorphometric results showed a significant increase in the amount of new bone over time for both groups increased from 1.96 ± 1.35 % to 36.8 ± 11.7% and the paste group from 0.08 ± 0.12% to 25.6 ± 7.6% (p < 0.05). The residual graft decreased in both groups after 10 weeks of repair. It is concluded that the formulations in granules and paste presented favorable results to the incorporation,

with formation of bone tissue in quantity and quality. However, the granules group showed greater formation of new bone over time, in all analyzes.

KEYWORDS: Bone substitutes, Histology, Histomorphometry, Microtomography, Maxillary Sinus surgery, Rabbits.

INTRODUCTION

Implantology plays an important role in the oral rehabilitation of toothless patients. It is considered an alternative to conventional fixed and removable prostheses. This therapeutic option makes it possible to restore patients' function and aesthetics in an effective and predictable way. Surgical planning must take into account the quantity and quality of the remaining alveolar bone and also the three-dimensional positioning of the implant for correct final prosthetic rehabilitation^{1,2}.

The resorption of the alveolar process in the maxilla posterior region and consequent pneumatization of maxillary sinuses can hinder the installation of osseointegrated implants in this region^{3,4}. Therefore, bone grafts and / or bone substitutes has been used for several years in order to decrease volumetric changes after extractions and restore bone volume, which allows implants installation with high success rates in grafted sites^{5,6,7}.

In order to overcome the disadvantages of using autogenous bone in maxillary surgeries, xenogenous and alloplastic grafts have been widely studied for maxillary sinus lifting procedures^{9,10}. However, the concern about *prions* related diseases using xenogenous grafts has turned the focus of current researches into the use of synthetic materials, also called alloplastics^{11,12}.

In this context, synthetic ceramics based on calcium phosphate have been widely used, mainly hydroxyapatite (HA), β -tricalcium phosphate (β -TCP) or a mixture of both (HA / β -TCP). These biomaterials are highly biocompatible and osteoconductive and they are commercially available in the form of blocks, granules or injectable pastes^{13,14,15}.

A high concentration of β -TCP in a bone substitute material is characterized by greater graft resorption during the incorporation period, with a consequent decrease in bone volume. However, a lower concentration of this same component can decrease the potential for bone neoformation. The absorption rate of β -TCP

compared to HA is faster, creating spaces for osteoprogenitor cells as well as accelerating the bone regeneration process^{16,17}. Studies have indicated that absorption rate of β -TCP is three to twelve times faster than that of HA¹⁸.

HA grafts have shown predictable and satisfactory results when used in maxillary sinus lift surgeries¹⁹. One of the main advantages of HA compared to other bone substitutes is its low absorption rate, which gives the graft volumetric stability and long-term mechanical resistance, that is, it acts as a support for cell migration and deposition of bone matrix^{15,20,21}.

From this point of view, HA / β -TCP biphasic ceramics have been extensively studied in pre-clinical and clinical trials. The combination of these two biomaterials in a single product allows a better three-dimensional volumetric graft maintenance due to the presence of HA and a fast-new bone formation due to β -TCP controlled resorption, when compared to its isolated forms^{17,22,23}.

Maxresorb® is a bone graft substitute of alloplastic origin, available both in granules or paste. The granule formulation consists of a combination of HA and β -TCP, in the proportion 60:40, being composed of macropores of 200 - 800 μ m and porosity of 80%. Its osteoconductive composition enables blood perfusion, facilitating cell adhesion and growth^{6,24}.

On the other hand, injectable formulation (Maxresorb® Inject) consists of a controlled absorption paste containing nanoparticles of HA and small granules of HA and β -TCP (also in the proportion 60:40), dispersed in a gel of water based. HA nanoparticles (size 15 - 50 nm) provide an extensive surface area for cellular interactions, thus promoting new bone formation. In addition, HA granules can contribute to long-term volumetric stability. From a clinical point of view, as it is a viscous and non-hardening formulation, it is easy to manipulate and adapt to the recipient site (<<https://botiss-dental.com/products/maxresorb-inject/>>. Access on: 20 July 2020).

Oh *et al.* (2019)²⁵, in a prospective clinical study involving 58 patients submitted maxillary sinus surgeries, compared microtomography and histomorphometry two bone graft materials: biphasic calcium phosphate (composed of 60HA / 40 β -TCP) and bone mineral graft deproteinized beef (Bio-Oss®). After 6 months, these authors observed that bone neof ormation prevailed in the group of patients submitted to the graft that contained biphasic calcium phosphate, in both analyzes.

However, to date, there is no study comparing the biological behavior of these two formulations, from the microtomographic and histomorphometric points of view. Therefore, this was the first study to compare the HA / β -TCP association in the form of paste or granule or paste in an animal model of maxillary sinus lifting.

MATERIALS AND METHODS

Ethical Statement

This study protocol was approved by Ethical Committee of the School of Dentistry Ribeirão Preto, USP, Brazil (2018.1.842.58.2). ARRIVE checklist was used in this experiment. All Brazilian animal ethical guiding principles for animal experiments were followed.

Study Design

Twenty New Zealand rabbits, 3.5 – 4.0 kg of weight and 5 – 6 months old were used, adopting a split-mouth design. Both maxillary sinuses were used to simulate a lateral approach for sinus floor elevation. The animals were divided into two groups of ten rabbits each, according to the experimental periods of 2 and 10 weeks.

Randomization and allocation concealment

Randomization and allocation concealment test and control sites were randomized electronically (www.randomization.com) by an author not involved in surgical procedures and sacrifices (V.F.B). The information about the allocation was provided by another person not involved in the surgical procedure (E.R.S) after the opening of the access window bilaterally.

Surgical procedures

All surgeries were performed by an experienced maxillofacial surgeon (MMC). Anesthesia was performed using Acepromazine (1.0 mg/kg; Acepran®, Vetrnil, Louveira, São Paulo, Brazil) was injected subcutaneously and subsequently xylazine (3.0 mg/kg; Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio LTDA, Paulínia, São Paulo, Brazil) and ketamine (50.0 mg /kg; Dopaser®, Sespo Indústria e Comércio LTDA, Paulínia, São Paulo, Brazil). After anesthesia, the animals received a prophylactic

dose of oxytetracycline dihydrate (40 mg / kg; Terramicina LA®, Zoetis Industry, Campinas, São Paulo, Brazil), 1% cetoprofeno (3.0 mg / kg; Ketofen, Bimeda-Mogivet Farmacêutica S.A., São Paulo, Brazil) and cloridrato tramadol (1.0 mg / kg; Halexlstar, Goiânia, Goiás, Brazil). Local anesthesia was also used.

Animals were shaved and antisepsis was performed in the experimental regions. An incision of about 2.0 cm in length was made along the midline of the nasal dorsum, followed by tissue divulsion up to the periosteum. After exposing nasal bone, nasoincisal suture and nasofrontal suture are limited. A trephine burr and a spherical diamond drill (Neodent, Curitiba, Paraná, Brazil) were used for performing bone windows on both sides of the nasal dorsum.

After elevation of the sinus membrane, one side received the material in granules (Maxresorb®, Botiss Biomaterials, Zossen, Germany, Figure 1a). The other side received the material in the form of a four-phase injectable paste (Maxresorb®, Botiss Biomaterials, Zossen, Germany, Figure 1a). An absorbable porcine collagen membrane (Bio-Guide, Geistlich Biomaterials) was used to cover anastomoses bilaterally (Figure 1b).

Maintenance care

All animals were kept in individual cages and in acclimatized rooms, under appropriate veterinary care and nutritional support. An animal monitoring protocol was carried out throughout the experimental period, by paying attention to basic biological functions, signs of behavior in relation to postoperative pain and evaluation of operative wounds for bleeding, suture dehiscence and / or signs infection.

Sacrifice

Performed by the anesthetic overdose method, then the animals were placed in a closed box containing carbon dioxide (CO₂). Biopsy specimens were obtained in blocks and fixed in 10% buffered formalin.

Micro-CT evaluations

After the fixation in 10% buffered formalin, the biopsies were scanned in a high resolution (SkyScan 1172®, Bruker, Kontich, Belgium). The following scanning parameters were used: exposure of 570 ms per movement, voltage of 89 kV, current

of 112 μA , isotropic resolution of 8.70 μm , 360° rotation around the vertical axis with 0.2° rotation step, average of 4 frames, using an Al + Cu filter.

The reconstruction of the images using the NRecon® 1.6.10 (Bruker, Kontich, Belgium), followed by the parameters: reduction of ring-shaped artifacts (Ring Artifact Correction) in the amount of 12, beam hardening (Beam Hardening) of 34% and smoothing of 2. The reconstructed images were repositioned using the software DataViewer® (Bruker, Kontich, Belgium), in which the volume of interest (VOI) of the specimens was determined. Subsequently, the CTAn® was used to perform the measurements by interpolating the regions of interest (ROI) selecting only the grafted areas in both maxillary sinuses of the rabbits.

The thresholds of gray levels to identify bone tissue and xenograft were set at 70 - 100 and 100 – 255, respectively, as published in a previous study²⁶. The total volume of the graft (TV) and the volume of mineralized tissue (BV / TV: new bone + residual graft) were obtained by the three-dimensional morphometric analysis of the total interpolation of the regions of interest (ROI) of each sample. A single calibrated examiner performed all analyzes.

Histological preparation

Two sections of each sinus of approximately 50 – 60 μm was prepared using precision cutting / wear equipment (Exakt, Apparatebau, Norderstedt, Germany). The slides were stained with toluidine blue and alizarin red, as performed in previous studies by our research group^{27,28}.

Calibration of the histomorphometric evaluation

The analyzes were performed by a single examiner (MMC), without prior knowledge of the samples, after a calibration with an experienced professional (ERS) and the intra-examiner agreement in the recognition of the tissue reached a $K > 0,90$.

Histological and Histomorphometric evaluations

All histological evaluations were performed in a Leica DMLB microscope (Leica, Wetzlar, Germany), equipped with a digital camera (Digital Sight DS-2Mv, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) connected to a computer, was used to obtain the photos of the slides.

Five distinct areas, from the grafted site, were determined and used for analysis. The

area close to the collagen membrane is called the “anthrostomy region (A)”, the areas close to the walls of “medial wall (M) and lateral wall (L)”, the central area of the graft “region of the center (C)” and the area near the sinus membrane (S) (Figure 2).

The software Image J 1.50i (National Institutes of Health, USA) was used for the measurements. A grid of 80 squares was superimposed on the images of the histological slides, and the points of intersection the squares were used as a reference to account for the structures present in of the area, with 100x magnification.

Histomorphometric measurements were calculated separately for each area. Mean and standard deviation values were calculated to assess bone neoformation (primary variable) and graft resorption. The evaluated structures included percentages of new bone, granules, paste and granules present in the paste. In addition, the percentage of new bone in the regions of the bone walls (lateral wall + medial wall) and the central region of the graft was averaged. Then, a descriptive histological analysis in each of the experimental periods was performed.

Statistical analyses

The data obtained were tabulated and submitted to statistical analysis using the IBM SPSS Statistic software (IBM Inc., Chicago, IL, USA). The results were expressed as mean and standard deviation. The normality of the residues was performed using the Shapiro-Wilk test. To compare bone neoformation between granules and paste groups in the two evaluation periods, the two-way ANOVA test was used. For comparison between groups in the same evaluation period, the F test was performed. The level of significance was set at 5%.

RESULTS

Microtomographic evaluation

Total graft volume

A volumetric contraction of the graft was observed over time in both groups. Between 2 and 10 weeks of healing, the total volumes (TV) of the granule and paste groups decreased from 104.8 ± 20.9 to 74.1 ± 16.0 mm³ and from 133.7 ± 34.6 mm³, which represents a reduction of 29.5% and 33.9% respectively ($p < 0.05$; Table 1; Figure

3). In the analysis between groups, a statistically significant difference was observed in two weeks.

Volume of mineralized tissue

After 2 and 10 weeks, the amount of mineralized tissue was $17.5 \pm 3.2 \text{ mm}^3$ to $23.2 \pm 1.6 \text{ mm}^3$ in the granule group ($p < 0.05$); and from $20.7 \pm 9.0 \text{ mm}^3$ to $25.2 \pm 6.4 \text{ mm}^3$ in paste group (Graph 1). When the groups were compared with each other, there was a tendency for greater formation of mineralized tissue in the granule group over time, but without statistical difference.

Volume of residual bone graft

The amount of residual graft in the granule group was 18.3 ± 2.8 to $23.5 \pm 6.3 \text{ mm}^3$; and from 9.2 ± 2.6 to $16.3 \pm 4.3 \text{ mm}^3$ in the paste group, after 2 and 10 weeks ($p < 0.05$). In the analysis between groups, a greater amount of residual graft was observed in the granule group after 2 and 10 weeks of repair ($p < 0.05$), as seen in Graph 2).

Histological evaluation

Within 2 weeks of repair, the raised maxillary sinus area had a uniform contour and integrity of the sinus membrane. The collagen membrane was positioned in the region of anarthrostomies, in both groups (Figure 4a).

In the granule group, a large amount of biomaterial particles of varying size and irregular shape was observed in the grafted area, surrounded by connective tissue, as seen in Figure 4a. In the paste group, there was a smaller amount of biomaterial particles of varying size and irregular shape. The spaces between the cells filled with mass around a large amount of connective tissue (Figure 4b).

In 10 weeks of observation, it was observed that the uniform contour of the grafted region remained and that the integrity of the sinus membrane was maintained. Collagen membranes were reabsorbed, making it possible to identify only remnants of their original constitution.

In the granules group, a complete and more regular closure of anthroostomy was observed through the formation of bone between the limits of the bone window, when compared to the paste group. A large amount of biomaterial was also noted, but the spaces between the particles were filled with newly formed bone tissue and vascularized connective tissue (Figure 5a). In group paste, an irregular closure of the anthroostomy with neoformed bone tissue was noted. The formation of new bone occurs mainly from the regions of the medial and lateral walls towards the center of the graft. The particles do not show signs of absorption, occupying part of the grafted area. On the other hand, a mass can be visualized in a small amount, due to the great absorption (Figure 5b).

In the regions close to the lateral and medial walls, in the period of 2 weeks, no group granules were observed large amount of biomaterial particles surrounded by richly vascularized connective tissue. On the surface of the biomaterial particles, the formation of a thin layer of immature bone tissue and the presence of osteoblasts were observed, as shown in Figures 6a and 7a. In the pasta group, a large amount of water-based gel was observed containing particles with a smaller diameter of the biomaterial and nanoparticles of HA, and surrounded by vascularized connective tissue, in a smaller amount. It was not possible to observe new bone (Figures 6b and 7b).

In the regions close to the lateral and medial walls, in the period of 10 weeks, the maturation of the newly formed tissue is observed, however with osteocytic fans, in both groups (Figures 8 and 9). In the granule group, the large amount of particles in the biomaterial was observed, but the spaces between the particles were filled with neoformed bone tissue and vascularized connective tissue. Small areas of graft absorption were observed on the surface of the biomaterial with the presence of osteoclasts (Figures 8a and 9a). In the paste group, the presence of particles from the biomaterial and a significant decrease in the amount of mass were observed, making it possible to visualize remnants of the mass. The spaces between the particles and the mass were filled with mature bone tissue and richly vascularized connective tissue. Absorption areas of the bone graft with the presence of osteoclasts were observed on the surface of the biomaterial (Figures 8b and 9b).

Histomorphometric evaluation

Evaluation of new bone

Histomorphometric results showed a significant increase in the amount of new bone over time for both. Between 2 and 10 weeks, the granule group increased from $1.96 \pm 1.35\%$ to $36.8 \pm 11,7\%$; and the paste group from $0.08 \pm 0,12\%$ to $25.6 \pm 7.6\%$ ($p < 0.05$). The intergroup analysis showed a higher percentage of new bone in the granule group at 2 weeks ($p < 0.05$). However, in 10 weeks, there was a smaller difference between the formulations, with a difference of only 1.4 times for the granules group ($p < 0.05$; graph 3).

In the granules groups, in 2 weeks, the percentage of new bone in the regions of the bone walls and the center of the graft was $3.5 \pm 2.1 \%$ and $0.4 \pm 1.0\%$ ($p < 0.05$); and $39.8 \pm 12.6\%$ and $36.6 \pm 8.2\%$ in 10 weeks ($p > 0.05$). For the paste group, in 2 weeks, new bone formation was observed only in the regions of the bone walls of 0.1 ± 0.3 . In 10 weeks, the percentage of new bone in the bone walls and in the center was $35.0 \pm 7.6\%$ and $16.0 \pm 10.1\%$ ($p < 0.05$; Table 2).

Evaluation of residual bone graft

The residual graft decreased in both groups after 10 weeks of repair. The amount of graft remaining in the granule group decreased from $52.0 \pm 9.0\%$ to $37.7 \pm 14,5\%$; in the paste group, from $59.5 \pm 12.7\%$ to $17.8 \pm 5.65\%$ ($p < 0.05$). In addition, over the periods of 2 and 10 weeks, there was a slight decrease in the granules present in the paste formulation. Comparing the granule and paste groups, there was greater absorption of residual graft in the paste group ($p < 0.05$; Graph 4).

DISCUSSION

This study aimed to compare the histomorphometric and microtomographic behavior of two formulations (i.e. paste and granules) of an alloplastic graft composed of a combination of tricalcium beta-phosphate and hydroxyapatite in maxillary sinus surgeries in rabbits. The experimental model in rabbits used in this study allows the assessment of bone grafts incorporation and neoformation, with a view to

establishing a parallel with what occurs in these processes in humans. Additionally, as it is a split mouth model type, the possible interferences between individuals has been reduced to the minimum acceptable. This methodology has been used in works recently published by the same research group.

Bone reconstruction techniques were developed to optimize the aesthetic-functional result of implant-supported oral rehabilitations. Several studies have shown satisfactory results in terms of implants survival and long-term volumetric graft maintenance in maxillary sinuses reconstructed with synthetic bone graft based on biphasic calcium phosphate^{1,9,29,30}.

This biomaterial is composed by the association of slow resorption hydroxyapatite (HA) with fast resorption beta-tricalcium phosphate (β -TCP), facilitating the migration of osteoprogenitor cells and contributing to the formation of new bone^{15,19,23,29,32}. In the present study, the Maxresorb® biomaterial was used in the proportion of 60HA and 40de β -TCP in the form of granules or paste. Jelusic et al. (2017)²², by means of a prospective randomized clinical study using the same biomaterial in granules, demonstrated good results in relation to bone neoformation and graft incorporation. However, there are, to date, no clinical and/or experimental studies evaluating the biological behavior of paste formulation of the Maxresorb®.

From the clinical point of view, the biomaterial in injectable paste has some differentials, such as the reduction of the operative time, easy handling and better adaptation to the receiving bed³³. For this reason, this study will be the first to compare the two formulations of Maxresorb® histologically and microtomographically.

The microtomographic evaluation proposed in this study aimed to investigate three-dimensionally the volumetric variations of the maxillary sinuses grafted with Maxresorb® in granules or paste, through the analysis of the total graft volume, amount of newly formed mineralized tissue and remaining graft in two times of experiments (ie 2 and 10 weeks). However, there was difficulty in determining the gray scale (*thresholding*) that accurately differentiated new bone from the remaining graft. This same limitation with regard to microtomographic analysis of grafts in the maxillary sinus of rabbits has recently been described by other authors^{30,31}. In the present study, for the purpose of standardization and comparison, two gray scales (*thresholding*) were determined, one for assessing mineralized tissue (*thresholding* 70 -

100, mm³) and another for residual bone graft (*thresholding* 100 - 255, mm³), as proposed by Iida *et al.* (2020)²⁶.

The microtomographic results of this study showed a superiority of the granules group in relation to the volumetric maintenance of the graft over time. The total volume of the graft showed a reduction of 29.5% for the granule group and 33.9% for the paste group after 10 weeks. These results may be associated with the presence of greater amount of graft remaining in the granule group, mainly due to the fact that the water-based has been reabsorbed. Lim *et al.* (2015)³⁴, in a randomized study in maxillary sinus surgeries in rabbits, microtomographic evaluated the biphasic calcium phosphate graft Osteon® in granules in different proportions (70HA / 30 β -TCP and 30 HA / 70 β -TCP). These authors observed a volumetric contraction of 18.5% and 19.5% respectively for the analyzed proportions, after a period of 8 weeks. However, the difference observed between the studies may be related to the experimental periods evaluated.

In relation to the formed mineralized tissue, it was not possible to observe a statistically significant difference between the granule and paste groups in 2 and 10 weeks. However, there seems to be a tendency for greater formation of mineralized tissue in the granule group in 10 weeks (granules: 17.5 ± 3.2 to 23.2 ± 1.6 mm³ vs paste: 20.7 ± 9.0 to 25.2 ± 6.4 mm³, in 2 and 10 weeks respectively). Lim *et al.* (2016)¹⁷, in a study using a methodology similar to this study, observed a greater amount of mineralized tissue after 8 weeks of repair in maxillary sinuses grafted with Osteon® in granules in different proportions (70HA / 30 β -TCP: 56.9 ± 9.9 mm³ and 30HA / 70 β -TCP: 65.9 ± 13.0 mm³). This superiority can be explained by the use of a larger initial amount of bone graft (~ 200 mm³) and by the difference in thresholding used between studies.

The present study showed an increase in the percentage of residual bone graft of 28.4% and 77.0% for the granule and paste groups, respectively, after 10 weeks. This increase in the amount of graft remaining in the granule group corroborates the findings by Iida *et al.* (2020)²⁶, in which an increase of 28.9% was also observed after 8 weeks. This fact may be related once again to the difficulty of differentiating new bone from pre-existing biomaterial.

In the histological analysis, it was possible to observe a slight bone neoformation after 2 weeks of repair, located close to the bone walls of the maxillary sinus, in the granule group. On the other hand, in the paste group, no new bone formation was

found, with a large amount of remaining bone graft being observed. In addition, a greater amount of vessels and inflammatory infiltrate was noted in the granule group. Masuda et al. (2019)³⁵ in a study performed on rabbit maxillary sinuses, also reported a small amount of new bone forming from the bone walls of the maxillary sinus after 2 weeks of repair.

In the 10-week period, there was an increase in the amount of newly formed bone tissue compared to the previous period in all regions analyzed. In addition, there was an intimate contact between the newly formed bone and the particles of the biomaterial, in both groups. Lambert et al. (2013)³⁶, in a comparative study between Bio-Oss® and a biphasic calcium phosphate-based graft (60HA / 40 β -TCP) in maxillary sinuses of rabbits, observed histological results similar to this study, however after a 5-week evaluation period.

It was noted that the biomaterial Maxresorb® in granule formulation showed an adequate new bone formation, due to the controlled resorption of the remaining graft and maintenance of part of the graft particles. However, it was observed that the aqueous gel contained in the injectable paste formulation was gradually replaced by new bone and the biomaterial particles were reabsorbed more slowly.

The use of the collagen membrane to cover antrostomies guaranteed the principles of guided bone regeneration, being completely visualized in 2 weeks. At the end of the tenth week, almost complete resorption of the collagen membrane was observed in both groups, corroborating the results found by other authors recently^{24,35,37,38}. Additionally, antrostomies were noted with neoformed bone tissue in most of the analyzed samples, in both groups. The granule group showed a better closure, with more regular and uniform bone formation. On the other hand, in the paste group, an irregular closure was observed, characterized by the formation of a bone depression in the region of antrostomies. These findings are in line with those obtained by Masuda et al (2019)³⁵, who observed this closure of antrostomies after an eight-week period.

In the present study, after histomorphometric analysis, it was possible to observe a statistical difference between the granule and paste groups with regard to the amount of new bone, with superiority of the granule group in both evaluated periods. In 10 weeks of repair, the percentage of new bone in the granule group was $36.8 \pm 11.7\%$ and $25.6 \pm 7.6\%$ in the paste group. Lambert et al (2013)³⁶ observed a greater bone neoformation in the biphasic calcium phosphate group ($16.0 \pm 3.7\%$ vs $21.5 \pm 3.8\%$,

respectively) after a longer evaluation period (ie 6 months). In another study, Lim et al (2015)³⁴ observed that the biomaterial in the proportion of 30HA / 70 β -TCP showed $22.0 \pm 2.28\%$ of new bone after 8 weeks; in the proportion of 30HA / 70 β -TCP, the amount of new bone was $21.1 \pm 4.8\%$. As a result, it was noted that the Maxresorb® graft was superior from the point of view of bone neoformation.

Corbella et al. (2016)¹, through a systematic review and meta-analysis, evaluated the histoformetric behavior of different bone substitutes used in maxillary sinus surgery. These authors observed, in the comparison between bovine bone graft and the association of HA + β -TCP, a greater amount of new bone for the alloplastic material. In a prospective clinical study, Jelusic et al. (2017)²² compared histomorphometrically the monophasic beta phosphate grafts (100% β -TCP, Bioresorb®) and the combination of HA + β -TCP (in the proportion of 60:40, Maxresorb®), both in the formulation of granules, in surgeries of maxillary sinus lifting. In the 6-month postoperative period, greater bone neoformation (38.42%) was observed in the group of patients who used the combination of HA + β -TCP. This percentage of new bone observed is close to that observed in the present study after 10 weeks of evaluation. In contrast, another clinical study using the Osteon® graft in the same proportion (60:40) observed a lower percentage of new bone (28.8%) after 6 months²⁵.

Similar to what occurs in the present study, clinical and experimental studies show that the formation of new bone occurs initially close to the regions of the bone walls or margins of the antrotomy proceeding towards the center of the grafted area^{28,38,39}.

Regarding the resorption of the remaining bone graft, a greater total amount of graft was observed for the paste group in both evaluated periods, and in this group, the resorption was fundamentally due to the degradation of the water-based gel. To date, there are no studies on the rate of resorption of beta-tricalcium phosphate in paste that serve as an object of comparison.

CONCLUSIONS

The formulations in granules and paste of the Maxresorb® graft showed favorable results to the incorporation, with formation of bone tissue in quantity and quality. The granules group showed superiority when compared to the paste group in relation to bone neoformation, in all analyzes. Both groups showed volumetric contraction and

graft resorption over time, being greater in the paste group. Bone neoformation occurred from the bone walls progressing towards the center of the maxillary sinuses, in both groups. However, it is important to emphasize that the findings of this study should be viewed with caution due to the limitations of the study

CONFLICT OF INTEREST

Conflict of Interest and Source of Funding Statement: The authors declare that they have no conflict of interest related to this study.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to Sebastião Carlos Bianco, Adriana Luisa Almeida e Mila Sprone Tavares Ricoldi for technical assistance.

REFERENCES

1. 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 Implants Res.* 2016 Sep;27(9):1106-22. doi: 10.1111/clr.12702. Epub 2015 Oct 10. PMID: 26452326.
2. Sakkas A, Wilde F, Heufelder M, Winter K, Schramm A. Autogenous bone grafts in oral implantology-is it still a "gold standard"? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent.* 2017 Dec;3(1):23. doi: 10.1186/s40729-017-0084-4. Epub 2017 Jun 1. PMID: 28573552; PMCID: PMC5453915.
3. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005 Feb;32(2):212-8. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00642.x. PMID: 15691354.
4. Del Fabbro M, Wallace SS, Testori T. Long-term implant survival in the grafted maxillary sinus: a systematic review. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2013 Nov-Dec;33(6):773-83. doi: 10.11607/prd.1288. PMID: 24116362.
5. Donos N, Mardas N, Chadha V. Clinical outcomes of implants following lateral bone augmentation: systematic assessment of available options (barrier membranes, bone grafts, split osteotomy). *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;35(8 Suppl):173-202. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01269.x. PMID: 18724850.
6. Konermann, A. *et al.* Bone substitute material composition and morphology differentially modulate calcium and phosphate release through osteoclast-like cells. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Nov;43(4-6). doi:10.1016/j.ijom.2013.10.017.
7. Dawson DR 3rd, El-Ghannam A, Van Sickels JE, Naung NY. Tissue Engineering: What is New? *Dent Clin North Am.* 2019 Jul;63(3):433-445. doi: 10.1016/j.cden.2019.02.009. Epub 2019 Apr 12. PMID: 31097136.
8. Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, Lattanzi W, Logroscino G. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med.* 2014 Oct;25(10):2445-61. doi: 10.1007/s10856-014-5240-2. Epub 2014 May 28. PMID: 24865980; PMCID: PMC4169585.
9. Mordenfeld A, Lindgren C, Hallman M. Sinus Floor Augmentation Using Straumann® BoneCeramic™ and Bio-Oss® in a Split Mouth Design and Later Placement of Implants: A 5-Year Report from a Longitudinal Study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016 Oct;18(5):926-936. doi: 10.1111/cid.12374. Epub 2015 Sep 10. PMID: 26358740.
10. Delgado-Ruiz RA, Calvo Guirado JL, Romanos GE. Bone grafting materials in critical defects in rabbit calvariae. A systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin Oral Implants Res.* 2018 Jun;29(6):620-634. doi: 10.1111/clr.12614. Epub 2015 May 20. PMID: 25996344.
11. Kim Y, Nowzari H, Rich SK. Risk of prion disease transmission through bovine-derived bone substitutes: a systematic review. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013 Oct;15(5):645-53. doi: 10.1111/j.1708-8208.2011.00407.x. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22171533.
12. Kim Y, Rodriguez AE, Nowzari H. The Risk of Prion Infection through Bovine Grafting Materials. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016 Dec;18(6):1095-1102. doi: 10.1111/cid.12391. Epub 2016 Feb 8. PMID: 26856530.
13. Lindgren C, Sennerby L, Mordenfeld A, Hallman M. Clinical histology of microimplants placed in two different biomaterials. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009 Nov-Dec;24(6):1093-100. PMID:

20162114.

14. Wallace SS, Froum SJ. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003 Dec;8(1):328-43. doi: 10.1902/annals.2003.8.1.328. PMID: 14971260.
15. Dutta SR, Passi D, Singh P, Bhuibhar A. Ceramic and non-ceramic hydroxyapatite as a bone graft material: a brief review. *Ir J Med Sci.* 2015 Mar;184(1):101-6. doi: 10.1007/s11845-014-1199-8. Epub 2014 Nov 27. PMID: 25428698.
16. Fariña NM, Guzón FM, Peña ML, Cantalapiedra AG. In vivo behaviour of two different biphasic ceramic implanted in mandibular bone of dogs. *J Mater Sci Mater Med.* 2008 Apr;19(4):1565-73. doi: 10.1007/s10856-008-3400-y. Epub 2008 Feb 26. PMID: 18299963.
17. Lim HC, Hong JY, Lee JS, Jung UW, Choi SH. Late-term healing in an augmented sinus with different ratios of biphasic calcium phosphate: a pilot study using a rabbit sinus model. *J Periodontal Implant Sci.* 2016 Feb;46(1):57-69. doi: 10.5051/jpis.2016.46.1.57. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26937294; PMCID: PMC4771838.
18. Schaefer S, Detsch R, Uhl F, Deisinger U, Ziegler G. How Degradation of Calcium Phosphate Bone Substitute Materials is influenced by Phase Composition and Porosity. *Adv. Eng. Mater.* 2011 Apr;13(4):342-350. doi: [10.1002/adem.201000267](https://doi.org/10.1002/adem.201000267)
19. Mangano C, Perrotti V, Shibli JA, Mangano F, Ricci L, Piattelli A, Iezzi G. Maxillary sinus grafting with biphasic calcium phosphate ceramics: clinical and histologic evaluation in man. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013 Jan-Feb;28(1):51-6. doi: 10.11607/jomi.2667. PMID: 23377047.
20. Ohsawa K, Neo M, Matsuoka H, Akiyama H, Ito H, Kohno H, Nakamura T. The expression of bone matrix protein mRNAs around beta-TCP particles implanted into bone. *J Biomed Mater Res.* 2000 Dec 5;52(3):460-6. doi: 10.1002/1097-4636(20001205)52:3<460::aid-jbm3>3.0.co;2-u. PMID: 11007613.
21. Zizzari VL, Zara S, Tetè G, Vinci R, Gherlone E, Cataldi A. Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016 Oct;122(4):392-402. doi: 10.1016/j.oooo.2016.04.010. Epub 2016 May 12. PMID: 27496576.
22. Jelusic D, Zirk ML, Fienitz T, Plancak D, Puhar I, Rothamel D. Monophasic β -TCP vs. biphasic HA/ β -TCP in two-stage sinus floor augmentation procedures - a prospective randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2017 Oct;28(10):e175-e183. doi: 10.1111/clr.12983. Epub 2016 Sep 29. PMID: 27683073.
23. Ohayon L. Maxillary sinus floor augmentation using biphasic calcium phosphate: a histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014 Sep-Oct;29(5):1143-8. doi: 10.11607/jomi.3422. PMID: 25216141.
24. Jung U-W, Cha J-K, Vignoletti F, Nuñez J, Sanz J, Sanz M. Simultaneous lateral bone augmentation and implant placement using a particulated synthetic bone substitute around chronic peri-implant dehiscence defects in dogs. *J Clin Periodontol.* 2017 Nov;44(11):1172-1180. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12802>.
25. Oh JS, Seo YS, Lee GJ, You JS, Kim SG. A Comparative Study with Biphasic Calcium Phosphate to Deproteinized Bovine Bone in Maxillary Sinus Augmentation: A Prospective Randomized and Controlled Clinical Trial. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2019 January/February;34(1):233-242. doi: 10.11607/jomi.7116. Epub 2018 Dec 5. PMID: 30521656.
26. Iida T, Baba S, Botticelli D, Masuda K, Xavier SP. Comparison of histomorphometry and microCT after sinus augmentation using xenografts of different particle sizes in rabbits. *Oral Maxillofac Surg.* 2020 Mar;24(1):57-64. doi: 10.1007/s10006-019-00813-x. Epub 2019 Dec 9. PMID: 31820198.

27. Iida T, Carneiro Martins Neto E, Botticelli D, Apaza Alccayhuaman KA, Lang NP, Xavier SP. Influence of a collagen membrane positioned subjacent the sinus mucosa following the elevation of the maxillary sinus. A histomorphometric study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2017 Dec;28(12):1567-1576. doi: 10.1111/cir.13027. Epub 2017 Jun 7. PMID: 28593727.
28. Omori Y, Ricardo Silva E, Botticelli D, Apaza Alccayhuaman KA, Lang NP, Xavier SP. Reposition of the bone plate over the antrostomy in maxillary sinus augmentation: A histomorphometric study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2018 Aug;29(8):821-834. doi: 10.1111/cir.13292. Epub 2018 Jun 7. PMID: 29876969.
29. LeGeros RZ, Lin S, Rohanzadeh R, Mijares D, LeGeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2003 Mar;14(3):201-9. doi: 10.1023/a:1022872421333. PMID: 15348465.
30. Lindgren C, Mordenfeld A, Hallman M. A prospective 1-year clinical and radiographic study of implants placed after maxillary sinus floor augmentation with synthetic biphasic calcium phosphate or deproteinized bovine bone. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012 Mar;14(1):41-50. doi: 10.1111/j.1708-8208.2010.00224.x. Epub 2010 May 11. PMID: 20491816.
31. Cordaro L, Bosshardt DD, 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 Implants Res.* 2008 Aug;19(8):796-803. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01565.x. PMID: 18705811.
32. Wang Y, Wang K, Li X, Wei Q, Chai W, Wang S, Che Y, Lu T, Zhang B. 3D fabrication and characterization of phosphoric acid scaffold with a HA/ β -TCP weight ratio of 60:40 for bone tissue engineering applications. *PLoS One.* 2017 Apr 13;12(4):e0174870. doi: 10.1371/journal.pone.0174870. PMID: 28406922; PMCID: PMC5390984.
33. Sohn DS, Bae MS, Choi BJ, An KM, Shin HI. Efficacy of demineralized bone matrix paste for maxillary sinus augmentation: a histologic and clinical study in humans. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Nov;108(5):e30-5. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.06.042. PMID: 19836711.
34. Lim HC, Zhang ML, Lee JS, Jung UW, Choi SH. Effect of different hydroxyapatite: β -tricalcium phosphate ratios on the osteoconductivity of biphasic calcium phosphate in the rabbit sinus model. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015 Jan-Feb;30(1):65-72. doi: 10.11607/jomi.3709. Epub 2014 Sep 26. PMID: 25265122.
35. Masuda K, Silva ER, Botticelli D, Apaza Alccayhuaman KA, Xavier SP. 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 Implants.* 2019 July/August;34(4):819-827. doi: 10.11607/jomi.7350. Epub 2019 Feb 15. PMID: 30768660.
36. Lambert F, Leonard A, Lecloux G, Sourice S, Pilet P, Rompen E. A comparison of three calcium phosphate-based space fillers in sinus elevation: a study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013 Mar-Apr;28(2):393-402. doi: 10.11607/jomi.2332. PMID: 23527340.
37. Choi KS, Kan JY, Boyne PJ, Goodacre CJ, Lozada JL, Rungcharassaeng K. The effects of resorbable membrane on human maxillary sinus graft: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009 Jan-Feb;24(1):73-80. PMID: 19344028.
38. Scala A, Lang NP, Velez JU, Favero R, Bengazi F, Botticelli D. Effects of a collagen membrane positioned between augmentation material and the sinus mucosa in the elevation of the maxillary sinus floor. An experimental study in sheep. *Clin Oral Implants Res.* 2016 Nov;27(11):1454-1461. doi: 10.1111/cir.12762. Epub 2016 Jan 11. PMID: 26754150.
39. Tanaka K, Iezzi G, Piattelli A, Ferri M, Mesa NF, Apaza Alccayhuaman KA, Botticelli D. Sinus Floor Elevation and Antrostomy Healing: A Histomorphometric Clinical Study in Humans. *Implant*

Dent. 2019 Dec;28(6):537-542. doi: 10.1097/ID.0000000000000932. PMID: 31425319.