

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO-FACIAL E
PERIODONTIA

Vitor Ferreira Balan

**Levantamento de seio maxilar com dois diferentes enxertos ósseos
inorgânicos de origem bovina. Um estudo experimental em
coelhos.**

Ribeirão Preto
2022

VITOR FERREIRA BALAN

**Levantamento de seio maxilar com dois diferentes enxertos ósseos
inorgânicos de origem bovina. Um estudo experimental em
coelhos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Samuel Porfirio Xavier

RIBEIRÃO PRETO

2022

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

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

FERREIRA BALAN, Vitor

Levantamento de seio maxilar com dois diferentes enxertos ósseos inorgânicos de origem bovina. Um estudo experimental em coelhos.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Xavier, Samuel Porfirio

1. Estudo animal. 2. Elevação do assoalho sinusal. 3. Consolidação óssea. 4. Osteocondutividade 5. Enxerto xenógeno.

Nome: FERREIRA BALAN, Vitor

Título: Levantamento de seio maxilar com dois diferentes enxertos ósseos inorgânicos de origem bovina. Um estudo experimental em coelhos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

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

A minha família, **Júlio Cezar Balan, Vera Márcia Ferreira Balan, Júlia Ferreira Balan, José Carlos Balan e Célia Scaliante Balan** pelos exemplos de amor e perseverança e persistência.

A minha noiva **Ana Beatriz Brandão de Souza** por todo amor, apoio e compreensão em dias turbulentos.

A todos que estiveram presentes nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

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

Ao meu grande amigo, **Eduardo Pires Godoy**, pela amizade e suporte em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

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

Ao **Prof. Dr. Erick Ricardo Silva**, pela amizade e todos os ensinamentos transmitidos.

Aos professores **Adalberto Luiz Rosa, Márcio Mateus Beloti, Cássio Evard Sverzut, Alexandre Elias Trivellato e Mário Taba Júnior** pelos ensinamentos transmitidos.

Às secretárias do departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, **Maria Isabel Gobbo Simonetti, Carla Daniela Lima da Silva e Aparecida Dulce de Oliveira Negreti** pela presteza e solicitude.

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

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

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

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

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

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão clínica do dorso nasal com duas osteotomias laterais a sutura naso-incisal. (a) Ambas osteotomias preparadas; um pequeno parafuso colocado na sutura naso-incisal entre os centros das osteotomias para auxiliar no subsequente processamento histológico; (b) Enxertos ósseos xenógenos colocados dentro do espaço elevado: Cerabone a esquerda e Bio-Oss a direita; (c) Membranas colágenas cobrindo as osteotomias.38

Figura 2. O microtomógrafo SkyScan® 1172 (Bruker, Kontich, Bélgica) do Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos e Biomateriais (LAB 3D BIO) da FORP- USP foi utilizado para escaneamento das peças. (Fonte:www.bruker.com/pt/products/microtomography)39

Figura 3. Esquema de referências. Cinco regiões do seio foram identificadas: região de osteotomia (A), área central do enxerto (C), região sub-seio, subjacente a mucosa sinusal (S), e regiões próximas às paredes ósseas medial (M) e lateral (L).41

Figura 4. Fotomicrografias de regiões do cerabone depois em 10 semanas de reparo sob magnificação de 100x. Observe as sombras escuras e translúcidas, regiões que após aumentar a intensidade da luz, revela osso novo (IBN). (a e c) Intensidade normal da luz; (b e d) Alta intensidade da luz. Os asteriscos brancos indicam exemplos de regiões de IBN44

Figura 5. Fotomicrografias após 2 semanas de reparo em magnificação de 16x. (a) Seio maxilar enxertado com Cerabone; (b) Seio maxilar enxertado com Bio-Oss. As lâminas foram coradas em azul de Stevanel e vermelho de alizarina. As setas amarelas indicam osso novo formado a partir da parede óssea medial do seio em ambas as lâminas.....45

Figura 6. Fotomicrografias após 2 semanas de reparo em magnificação de 100x. Osso novo formado a partir das paredes ósseas cercando grânulos de (a) Cerabone e (b) Bio-Oss. Osso novo formado a partir das bordas da osteotomia no lado (c) Cerabone e (d) Bio-Oss. (a e b) Foram corados com azul de Stevanel e vermelho de alizarina, enquanto (c e d) foi corado com azul de toluidina. As setas amarelas indicam osso novo, os asteriscos amarelos marcam o osso nativo mais antigo, os asteriscos vermelhos demonstram o biomaterial e as setas vermelhas indicam osteoclastos.....46

Figura 7. Fotomicrografia após 10 semanas de reparo em magnificação de 16x. Osso novo é encontrado em todas as regiões examinadas no lado (a) Cerabone e (b) Bio-Oss. As lâminas foram coradas em azul de Stevanel e vermelho de alizarina.....47

Figura 8. Fotomicrografia após 10 semanas de reparo em magnificação de 100x. Osso novo incorporado a grânulos em ambos os biomateriais e formando pontes que interconectam os grânulos. (a e c) Grânulos de Cerabone e (b e d) grânulos de Bio-Oss. (a e b) Foram corados com azul de Stevanel e vermelho de alizarina, enquanto (c e d) foi corado com azul de toluidina.47

Figura 9. Imagens 3D de microtomografia representando o reparo no seio maxilar após 2 semanas. (a)Vista coronal; (b) do seio; (c) do osso nasal. O biomaterial Cerabone está à esquerda enquanto Bio-Oss a direita da imagem50

Figura 10. Imagens 3D de microtomografia representando o reparo no seio maxilar após 10 semanas. (a)Vista coronal; (b) do seio; (c) do osso nasal. O biomaterial Cerabone está à esquerda enquanto Bio-Oss a direita da imagem.....51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Porcentagem de osso novo e enxerto remanescente dentro da área elevada total. $P < 0,05$49
- Tabela 2.** Porcentagem de osso total após 2 semanas de reparo. Considerando todas as regiões da área elevada. $P < 0,05$49
- Tabela 3.** Porcentagem de osso novo após 10 semanas de reparo. Considerando todas as regiões da área elevada. $P < 0,05$51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Formação de osso novo e reabsorção de enxerto xenógeno entre 2 e 10 semanas de reparo.50

Gráfico 2. Porcentagem de osso novo avaliado através de análise microtomográfica utilizando diferentes níveis de cinza: 60 a 80 e 70 a 100.....52

LISTA DE SÍMBOLOS

μm - Micrometro

mm - Milímetro

mm³ - Milímetro cúbico

cm - Centímetro

mg - Miligrama

g - Grama

kg - Quilograma

ml - Mililitro

ms - Milissegundo

μA - Microampere

AL – Alumínio

KV - Quilovolt

H - Hora

TM – Trade mark

® - Marca registrada

% - Porcento

°C – Grau Celcius

LISTA DE ABREVIações

IBN - Rede óssea interpenetrante

DBBM – Osso mineral bovino desproteinizado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 PROPOSIÇÃO	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Amostra animal	41
3.2 Desenho do estudo e cálculo amostral	41
3.3 Biomateriais	42
3.4 Randomização	42
3.5 Procedimento Cirúrgico.....	43
3.6 Manutenção dos animais	44
3.7 Eutanásia	44
3.8 Avaliação microtomográfica	45
3.9 Preparação histológica	46
3.10 Avaliações histomorfométricas	46
3.11 Análise de dados	48
4 RESULTADOS	49
4.1 Avaliação histológica descritiva.....	51
4.2 Avaliação histomorfométrica	54
4.3 Avaliação microtomográfica	57
4.4 Correlação entre análise histológica e microtomográfica em 10 semanas	59
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÃO	69
7 REFERÊNCIAS	73

ANEXOS 83

ARTIGO PUBLICADO 85

Levantamento de seio maxilar com dois diferentes enxertos ósseos inorgânicos de origem bovina. Um estudo experimental em coelhos.

Vitor Ferreira Balan¹, Daniele Botticelli², David Peñarrocha-Oltra³, Katsuhiko Masuda⁴, Eduardo Pires Godoy¹, Samuel Porfirio Xavier¹

¹ Departamento de Cirurgia Bucomaxilofacial e Periodontia, Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

² Academia ARDEC, Rimini, Itália.

³ Departamento de Estomatologia, Faculdade de Medicina e Odontologia, Universidade de Valência, Valência, Espanha.

⁴ Departamento de Odontologia Pediátrica, Divisão de Infecção Oral e Controle de Doenças, Universidade de Osaka, Osaka, Japão.

Correspondência dos Autores:

Vitor Ferreira Balan: vitor.balan@usp.br

Daniele Botticelli: daniele.botticelli@gmail.com

David Peñarrocha-Oltra: david.penarrocha@uv.es

Katsuhiko Masuda: masuda.kaji.dental1@nifty.com

Eduardo Pires Godoy: eduardo.godoy@usp.br

Samuel Porfirio Xavier: spx@forp.usp.br

Palavras-chave: Estudo animal, elevação do assoalho sinusal, consolidação óssea, osteocondutividade, enxerto xenógeno.

FERREIRA BALAN, Vitor. Levantamento de seio maxilar com dois diferentes enxertos ósseos inorgânicos de origem bovina. Um estudo experimental em coelhos. [Dissertação - Mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2022.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi comparar o reparo sequencial de seios maxilares enxertados com dois substitutos ósseos xenógenos diferentes processados em temperatura baixa (300°C) ou alta (1200°C). Um procedimento de levantamento do seio maxilar foi realizado bilateralmente em 20 coelhos e dois enxertos ósseos xenógenos diferentes foram usados aleatoriamente para preencher os espaços elevados. O reparo foi estudado após 2 e 10 semanas, em 10 coelhos durante cada período. Após 2 semanas de reparo, quantidades muito pequenas de osso novo foram observadas em ambos os grupos, e foram principalmente confinadas às paredes ósseas do seio e bordas da osteotomia. Após 10 semanas de reparo, foi encontrado osso novo em todas as regiões, com maiores percentuais naquelas próximas às paredes ósseas e à osteotomia. Nesse período de reparo, a proporção de osso novo no grupo 300°C foi de 20,0% ± 4,3%, e no grupo 1200°C foi de 17,2% ± 4,3% (P = 0,162). No grupo 1200°C, sombras translúcidas e escuras em forma de neblina nas regiões dos enxertos estavam escondendo porções de osso novo (rede óssea interpenetrante). O presente estudo ilustrou que ambos os biomateriais forneceram condições que permitiram o crescimento ósseo dentro do espaço elevado, confirmando que ambos os biomateriais são adequados para serem usados como enxerto para aumento do assoalho do seio.

Palavras-chave: Estudo animal, elevação do assoalho sinusal, consolidação óssea, osteocondutividade, enxerto xenógeno.

ABSTRACT

The aim of the present study was to compare the sequential healing of maxillary sinuses grafted with two different xenogeneic bone substitutes processed at either a low (300°C) or high (1200°C) temperature. A sinus augmentation procedure was performed bilaterally in 20 rabbits and two different xenogeneic bone grafts were randomly used to fill the elevated spaces. Healing was studied after 2 and 10 weeks, in 10 rabbits during each period. After 2 weeks of healing, very small amounts of new bone were observed in both groups, and were mainly confined to close to the sinus bone walls and osteotomy edges. After 10 weeks of healing, new bone was found in all regions, with higher percentages in those close to the bone walls and to the osteotomy. In this period of healing, the proportion of new bone in the 300°C group was $20.0\% \pm 4.3\%$, and in the 1200°C group it was $17.2\% \pm 4.3\%$ ($P = 0.162$). In the 1200°C group, translucent, dark fog-like shadows in regions of the grafts were hiding portions of new bone (interpenetrating bone network). The present study illustrated that both biomaterials provided conditions that allowed bone growth within the elevated space, confirming that both biomaterials are suitable to be used as a graft for sinus floor augmentation.

Key words: animal study, bone healing, histology, sinus floor augmentation, sinus membrane

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O levantamento de seio maxilar é um procedimento amplamente utilizado para restaurar o volume ósseo perdido na região posterior da maxila em pacientes que necessitam de reabilitação implantossuportada (PJETURSSON et al., 2008).

Vários estudos mostraram que a mucosa sinusal tende a retornar à sua posição original se implantes ou biomateriais não forem inseridos no espaço criado por sua elevação (ASAI et al., 2002; XU et al., 2004). Para contrapor a contração de volume, tem sido sugerido o uso de biomateriais (CORBELLA et al., 2016), implantes (ELLEGAARD et al., 1997, 2006; LUNDGREN et al., 2004; SCALA et al., 2010, 2012) ou dispositivos (CRICCHIO et al., 2009, 2011; SCHWEIKERT et al., 2012; JOHANSSON et al., 2012). O osso autógeno ainda é considerado o material de preenchimento de escolha para o levantamento do assoalho do seio (KLIJN et al., 2010); entretanto, altas taxas de reabsorção volumétrica de osso autógeno têm sido relatadas (SCALA et al., 2015; DE SANTIS et al., 2017), além da morbidade cirúrgica associada ao sítio doador (CLAVERO et al., 2003).

Diversos materiais de enxertia são estudados na literatura para preenchimento do seio maxilar elevado, dentre os quais grânulos ósseos xenógenos, derivados de diferentes espécies animais (CORBELLA et al., 2016). Entre os xenoenxertos, o osso mineral bovino desproteínizado (DBBM) processado a baixa temperatura (300°C) vem sendo utilizado em diversos estudos clínicos (JENSEN et al., 2012a, 2012b; SBORDONE et al., 2011; MANFRO et al., 2014; MOON et al., 2015; MMORDENFELD et al., 2016) e em animais (ASAI et al., 2002; XU et al., 2004; DE SANTIS et al., 2017; CANEVA et al., 2017; IIDA et al., 2020; HIROTA et al., 2020). Esse osso xenógeno apresenta reabsorção lenta e excelentes propriedades osteocondutoras (CANEVA et

al., 2017; BUSENLECHNER et al., 2009; GALINDO-MORENO et al., 2014; GODOY et al., 2021).

Outro osso bovino desproteínizado produzido apenas a partir da fase mineral pura de osso bovino e sinterizado em alta temperatura (> 1200°C) tem sido usado para aumento do assoalho do seio maxilar (RIACHI et al., 2012; TAWIL et al., 2018; PERIĆ et al., 2018; MAHESH et al., 2020; IMAI ET AL., 2020; ZAHEDPASHA et al., 2021). Esse enxerto xenógeno também tem sido empregado em experimentos com animais, utilizando diferentes modelos e locais como câmaras preparadas em dobras cutâneas no dorso de hamsters (LASCHKE et al., 2007), defeitos críticos em ulna de coelho (HUBER et al., 2008), defeitos circunferenciais ao redor de implantes dentários em mini porcos (CATROS et al., 2020) ou defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos albinos (SHAKIR et al., 2018). Um modelo animal utilizando coelhos para cirurgia de levantamento de seio maxilar mostrou-se o mais apropriado para experimentos, principalmente devido à sua semelhança com a anatomia humana; ambos possuem cavidade ampla e acessível, óstio bem definido e sistema mucociliar com as mesmas características (KUMLIEN et al., 1985; KENNEDY et al., 1989).

Em um estudo clínico comparativo de Bio-Oss (Geistlich, Wolhusen, Suíça) e Cerabone (Botiss Biomaterials, Zossen, Alemanha) usados na cirurgia de levantamento do seio maxilar, foi observado que o Cerabone possuía partículas maiores (1:2,7) e uma liberação gradual menos intensa de íons cálcio (RIACHI et al., 2012). Além disso, em avaliação radiográfica realizada após 4 anos, observou-se perda volumétrica mais pronunciada para Bio-Oss em comparação com Cerabone (RIACHI et al., 2012). Um estudo in vitro relatou um nível mais alto de hidrofiliabilidade para Cerabone em comparação com Bio-Oss (TRAJKOVSKI et al., 2018).

Nas análises histológicas, os seios maxilares de coelhos preenchidos com DBBM apresentaram boa quantidade de osso neoformado, proporcionando manutenção do espaço criado dentro da área elevada (ASAI et al., 2002; XU et al., 2004; CANEVA et al., 2017). Não há relatos na literatura envolvendo o aumento do seio maxilar em animais que compararam os resultados do reparo utilizando Bio-Oss e Cerabone como substitutos ósseos. Assim, o objetivo do presente estudo foi comparar o reparo sequencial de seios maxilares enxertados com dois substitutos ósseos xenógenos diferentes processados em baixa ou alta temperatura.

2. PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi comparar o reparo sequencial de seios maxilares enxertados com dois substitutos ósseos xenógenos diferentes processados em baixa ou alta temperatura.

3. *MATERIAL E MÉTODOS*

3 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP, SP-Brasil; 2019.1.113.58.1). – Anexo 1) em 8 de abril de 2019. O estudo é relatado de acordo com as diretrizes ARRIVE. As diretrizes para cuidados com os animais adotadas no Brasil foram rigorosamente seguidas.

3.1 Amostra animal

Um total de 20 coelhos brancos da raça New Zealand, machos adultos, com peso aproximado de 3,5 a 4,0 kg e idade de 5 a 6 meses foram utilizados no presente estudo seguindo metodologia previamente publicada (COSTA et al., 2021).

3.2 Desenho do estudo e cálculo amostral

Um estudo randomizado de boca dividida foi usado para eliminar interferências entre sujeitos do mesmo grupo. O levantamento do seio foi realizado bilateralmente e dois materiais ósseos xenogênicos bovinos diferentes, sinterizados a 300°C (grupo Bio-Oss) ou 1200°C (grupo Cerabone), foram usados para preencher os dois espaços elevados. Foram analisados dois períodos de reparo: 2 e 10 semanas, com 10 animais cada período.

O tamanho da amostra foi determinado considerando dados de estudo anterior disponíveis no momento do cálculo do tamanho amostral (GODOY et al., 2021),

aplicando-se $\alpha = 0,05$, poder = 0,8 e correlação entre as medidas de 0,5. Assim, para esta configuração, o tamanho da amostra foi de 10 animais por grupo (dois grupos, $n = 10$) para permitir aos autores encontrar significância estatística entre os grupos experimentais.

3.3 Biomateriais

Bio-Oss é um Osso Mineral Bovino Desproteínizado (DBBM) com sinterização a 300° , porosidade de 75% a 80%, poros de 20 a 200 μm e tamanho médio de partícula de 0,5 a 1,0 mm (LEE et al., 2017). Já o Cerabone é formado completamente por hidroxiapatita de osso esponjoso bovino, com sinterização a 1200°C , porosidade de 65% a 80%, poros de 600 a 900 μm e tamanho médio de partícula de 0,5 a 1,0 mm (LEE et al., 2017).

3.4 Randomização

A randomização entre grupos e períodos de reparo foi realizada eletronicamente (randomization.com) por um autor que não estava envolvido na seleção e manuseio de animais e/ou procedimentos cirúrgicos (SPX) em 5 de maio de 2019. As alocações de tratamento foram asseguradas e seladas em envelopes opacos e revelados ao cirurgião (VFB) imediatamente após a realização da osteotomia e elevação da mucosa sinusal.

3.5 Procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um cirurgião especialista (VFB). A sedação foi realizada com acepromazina 1,0 mg/kg (Acepran®, Vetnil, Louveira, São Paulo, Brasil) administrada por via intramuscular, seguida da anestesia realizada com xilazina 3,0 mg/Kg (Dopaser®, Hertape Calier, Juatuba, Minas Gerais, Brasil) e cloridrato de cetamina 50mg/kg (Ketamin Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) IM. No pré-operatório, os animais receberam uma dose profilática de oxitetraciclina 20 mg/kg por via intramuscular (Biovet, Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil), meloxicam 0,2%, 1,0mg/kg por via subcutânea (Flamavet; União Química Farmacêutica S/A., Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) e cloridrato de tramadol 5,0 mg/kg por via subcutânea (Halexlstar; Goiânia, Goiás, Brasil). As medicações anti-inflamatória: meloxicam 0,2%, 0,5 mg/kg por via subcutânea (Flamavet; União Química Farmacêutica S/A., Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) e cloridrato de tramadol 5,0 mg/kg por via subcutânea (Halexlstar; Goiânia, Goiás, Brasil) foram mantidos nos primeiros dois dias de pós-operatório, administrados 1 vez ao dia.

A área operada foi tricotomizada e a antissepsia feita pela aplicação tópica de solução de iodo polivinilpirrolidona a 1% (Riodeíne Tintura, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil). A anestesia local realizada com mepivacaína 2% e epinefrina 1:100.000 (Mepiadre, Nova DFL, Rio de Janeiro, Brasil). Através de uma incisão no dorso nasal, o osso nasal foi exposto e foram confeccionadas osteotomias bilateralmente à sutura naso-incisal. A mucosa sinusal foi elevada e os espaços subnais foram preenchidos aleatoriamente com quantidades semelhantes dos dois

biomateriais. As osteotomias foram posteriormente cobertas com membrana de colágeno (Bio-Gide, Geistlich) e as feridas fechadas com suturas (Figura1).



Figura 1: Visão clínica do dorso nasal com duas osteotomias laterais a sutura naso-incisal. **(a)** Ambas osteotomias preparadas; um pequeno parafuso colocado na sutura naso-incisal entre os centros das osteotomias para auxiliar no subseqüente processamento histológico; **(b)** Enxertos ósseos xenógenos colocados dentro do espaço elevado: Cerabone a esquerda e Bio-Oss a direita; **(c)** Membranas colágenas cobrindo as osteotomias.

3.6 Manutenção dos animais

Cada animal foi mantido em gaiola individual (1 animal/6000 cm²) e em sala climatizada com ar condicionado Split (21° C) sem controle de umidade, com 34 trocas de ar/hora. Controle de iluminação automático de 12/12h. As feridas e as funções biológicas foram cuidadosamente monitoradas por médicos veterinários durante todo o período do experimento. Os animais tiveram acesso a comida e água filtrada *ad libitum*.

3.7 Eutanásia

Primeiramente foi realizada a sedação com acepromazina 1,0 mg/kg (Acepran®, Vetnil, Louveira, São Paulo, Brasil) concomitantemente a xilazina 3,0 mg/Kg (Dopaser®, Hertape Calier, Juatuba, Minas Gerais, Brasil) e cloridrato de cetamina 50mg/kg (Ketamin Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) administradas por via intramuscular. Em seguida os

animais foram levados um a um para a câmara de CO₂, com fluxo controlado de 7L/min na ordem de 20% do volume total. Esse fluxo foi mantido por pelo menos 1 minuto após a confirmação da morte clínica do animal, verificando sinais de parada respiratória, cianose das mucosas e ausência de pulso.

3.8 Avaliação microtomográfica

Uma análise microtomográfica foi realizada usando um equipamento microCT 1172 (Bruker, Kontich, Bélgica). Os parâmetros utilizados foram: pixel isotrópico de 9,92 μm , 60/165 KV, 134 μA , filtro Al 0,5 mm, tempo de exposição 596 ms, etapa de rotação 0,4 graus, média de 4 quadros e movimento aleatório 10. Para reposicionar as imagens transversais foi utilizado o software DataViewer® (Bruker, Kontich, Bélgica). As medições foram tomadas através do software CTan (Bruker, Kontich, Bélgica). Todas as avaliações foram realizadas por um autor calibrado. (Figura 2).



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

3.9 Preparação histológica

Equipamento de corte/retificação de precisão (Exakt, Apparatebau, Norderstedt, Alemanha) foi utilizado para preparar duas lâminas histológicas de cada biópsia realizada após serem desidratadas em uma sequência crescente de álcoois e incluídos e polimerizados em resina (LR White Hard Grid, London Resin, Berkshire, UK). O pequeno parafuso colocado na sutura naso-incisal foi utilizado como referência para o corte. As lâminas foram coradas em azul de toluidina ou azul de Stevanel e vermelho de alizarina.

3.10 Avaliações histomorfométricas

As fotomicrografias foram obtidas com o microscópio (Leica DMLB, Wetzlar, Alemanha) equipado com uma câmera digital (Digital Sight DS-2Mv, Nikon, Tóquio, Japão).

As seguintes regiões foram analisadas dentro do espaço elevado (: parede óssea medial (M), parede óssea lateral (L), região sub-sinusal (S), área central (C) e região da osteotomia (A) (Figura 3).

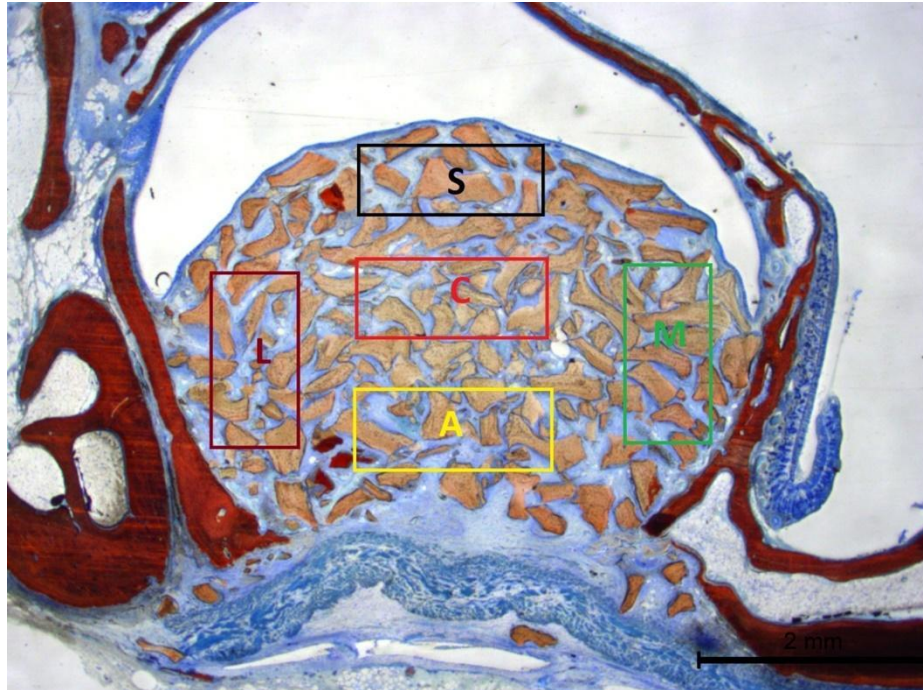


Figura 3: Esquema de referências. Cinco regiões do seio foram identificadas: região de osteotomia (A), área central do enxerto (C), região sub-seio, subjacente a mucosa sinusal (S), e regiões próximas às paredes ósseas medial (M) e lateral (L).

Uma grade de 80 quadrados foi sobreposta às imagens das lâminas histológicas usando o software ImageJ 1.50i (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) e um procedimento de contagem de pontos com aumento de 100x foi adotado para medidas morfométricas (SCHROEDER et al., 1973). Osso novo (não coberto por sombras de enxerto), rede óssea interpenetrante (IBN; enxerto ósseo translúcido no grupo Cerabone) e osso xenogênico residual foram avaliados. O osso total foi calculado como a soma de osso novo e IBN. As porcentagens foram calculadas em relação à área total da região avaliada e obteve-se um valor médio para as cinco regiões. Antes de realizar as mensurações, foi realizada calibração com outro examinador especialista (SPX) até que um coeficiente de correlação interclasses $k > 0,9$ fosse alcançado para reconhecimento do tecido.

3.11 Análise de dados

A porcentagem média de osso novo em todo o espaço elevado foi descrita como a variável primária. Os dados das várias regiões foram utilizados para estabelecer uma descrição mais detalhada da formação óssea.

O software Prism 9.1.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para análises estatísticas. A distribuição normal das variáveis foi avaliada com o teste de Shapiro Wilk para variáveis pareadas e não pareadas. Um teste t pareado ou um teste de Wilcoxon também foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos Bio-Oss e Cerabone. As diferenças entre os dois períodos de reparo foram avaliadas usando um teste t não pareado ou um teste de Mann-Whitney.

Um coeficiente de correlação bicaudal de Spearman foi aplicado para medir a força da correlação entre os resultados das análises histológicas e microtomográficas. GraphPad Prism 9.1.1 foi usado. O coeficiente de correlação e os valores de P foram relatados. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

As tabelas apresentam valores expressos em médias, desvios padrão, valores P médios, medianas e percentis 25% e 75%, enquanto no texto foram informados apenas valores médios.

4. *RESULTADOS*

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação histológica descritiva

Na análise histológica, a superfície do biomaterial foi bem definida para os grânulos de Bio-Oss enquanto que para Cerabone, sombras translúcidas em forma de névoa escura deram aos grânulos uma periferia indefinida. Em alguns casos, especialmente no período de 10 semanas, essas sombras ocultaram a presença de osso novo que foi revelado quando a intensidade da luz foi aumentada e as fotomicrografias foram obtidas com a câmera acoplada ao microscópio (IBN) (Figura 4).

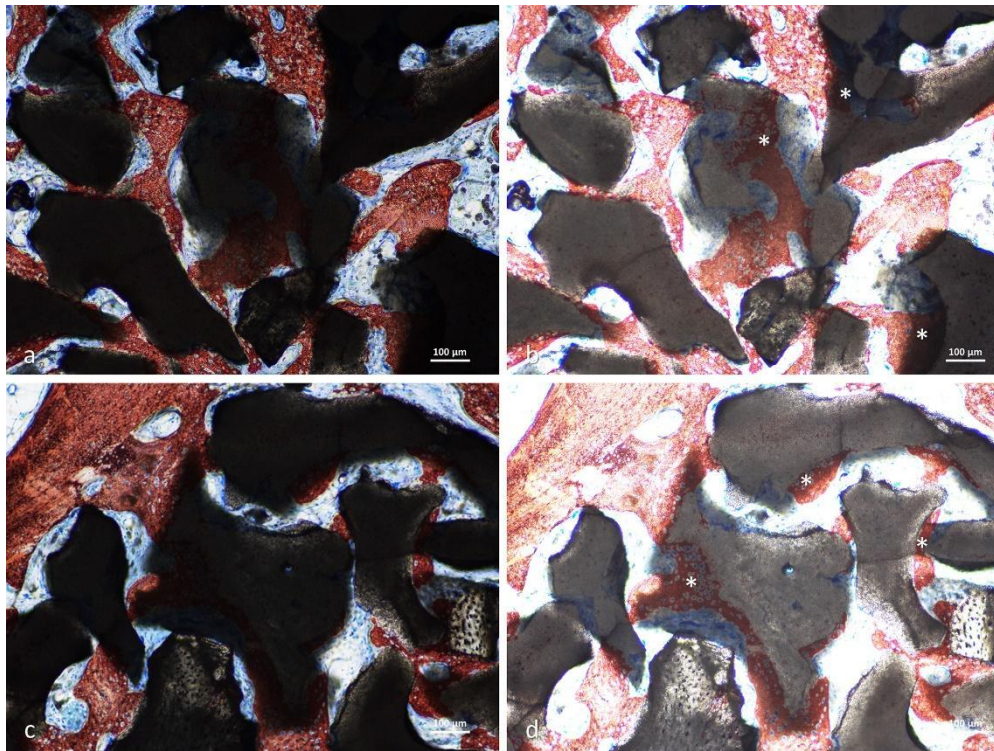


Figura 4: Fotomicrografias de regiões do seio contendo grânulos de Cerabone depois em 10 semanas de reparo sob magnificação de 100x. Observe as sombras escuras e translúcidas, regiões que após aumentar a intensidade da luz, revela osso novo (IBN). **(a e c)** Intensidade normal da luz; **(b e d)** Alta intensidade da luz. Os asteriscos brancos indicam exemplos de regiões de IBN.

Após 2 semanas de reparo, quantidades muito pequenas de osso novo foram observadas em ambos os grupos, principalmente confinadas às paredes ósseas

do seio e bordas da osteotomia, enquanto as outras regiões estavam praticamente desprovidas de osso novo. O material de enxerto ocupou quase metade do espaço elevado (Figura 5).

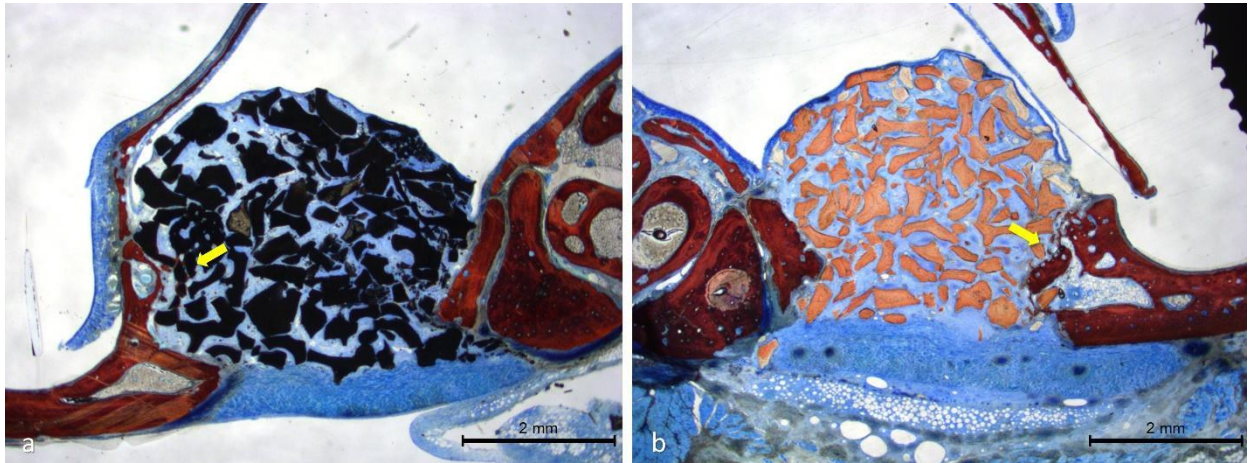


Figura 5: Fotomicrografias após 2 semanas de reparo em magnificação de 16x. **(a)** Seio maxilar enxertado com Cerabone; **(b)** Seio maxilar enxertado com Bio-Oss. As lâminas foram coradas em azul de Stevanel e vermelho de alizarina. As setas amarelas indicam osso novo formado a partir da parede óssea medial do seio em ambas as lâminas.

As cristas de osso novo emergindo das paredes ósseas do seio em direção ao centro do espaço elevado incorporaram os grânulos mais próximos em ambos os grupos Cerabone (Figura 6).

Os grânulos mais distantes das paredes ósseas foram circundados por tecido mole, apresentando uma densa camada de células fibroblásticas dispostas ao longo da superfície do enxerto. Algumas células semelhantes a osteoclastos também foram observadas na superfície de ambos os biomateriais (Figura 6). A osteotomia ainda estava recoberta pela membrana de colágeno (Figura 5) envolvida em processos de degradação. A formação de osso novo a partir das bordas das osteotomias, visando o fechamento do defeito (Figura 6). Alguns grânulos foram encontrados em alguns espécimes além da osteotomia em ambos os grupos.

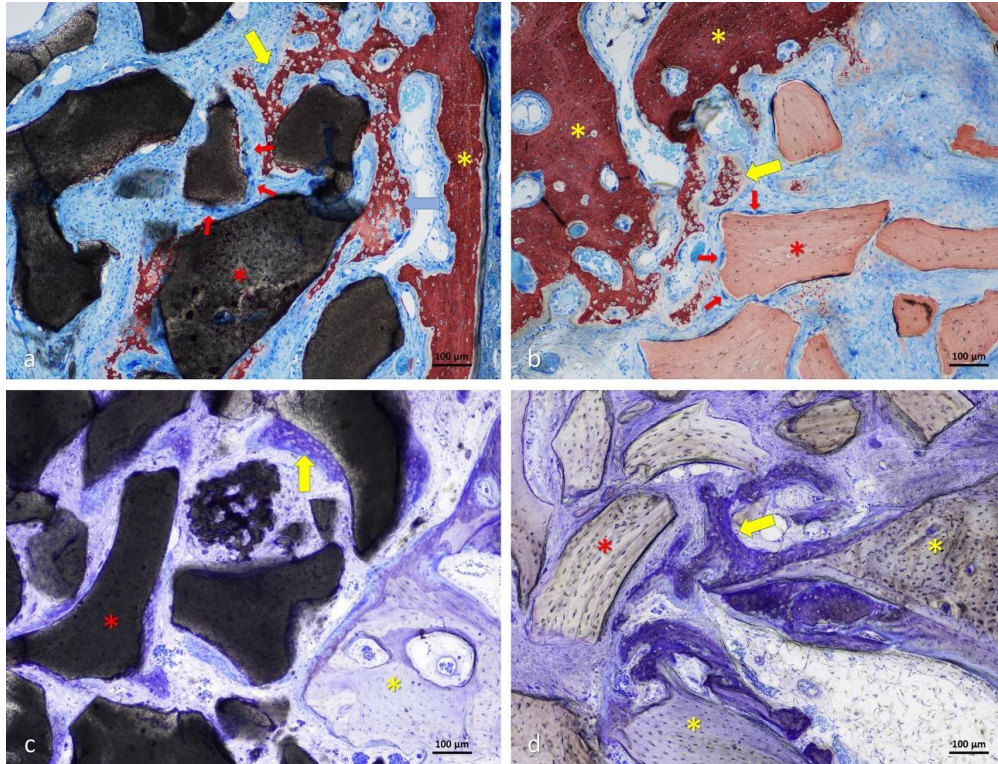


Figura 6: Fotomicrografias após 2 semanas de reparo em magnificação de 100x. Osso novo formado a partir das paredes ósseas cercado grânulos de **(a)** Cerabone e **(b)** Bio-Oss. Osso novo formado a partir das bordas da osteotomia no lado **(c)** Cerabone e **(d)** Bio-Oss. **(a e b)** Foram corados com azul de Stevanel e vermelho de alizarina, enquanto **(c e d)** foi corado com azul de toluidina. As setas amarelas indicam osso novo, os asteriscos amarelos marcam o osso nativo mais antigo, os asteriscos vermelhos demonstram o biomaterial e as setas vermelhas indicam osteoclastos.

Após 10 semanas de reparo, foi encontrado osso novo em todas as regiões, com maiores percentuais registrados nas regiões próximas às paredes ósseas e à osteotomia (Figura 7). Os grânulos apresentaram maior teor de incorporação no osso recém-formado em comparação ao período de reparo anterior (Figura 8). As regiões subjacentes à mucosa sinusal apresentaram as menores quantidades de osso novo. A maioria das osteotomias foi fechada por osso neoformado com sinais de remodelação. A degradação da membrana de colágeno ainda não foi completada (Figura 7). Alguns grânulos foram encontrados além da osteotomia e várias perfurações da mucosa sinusal foram observadas para ambos os biomateriais.

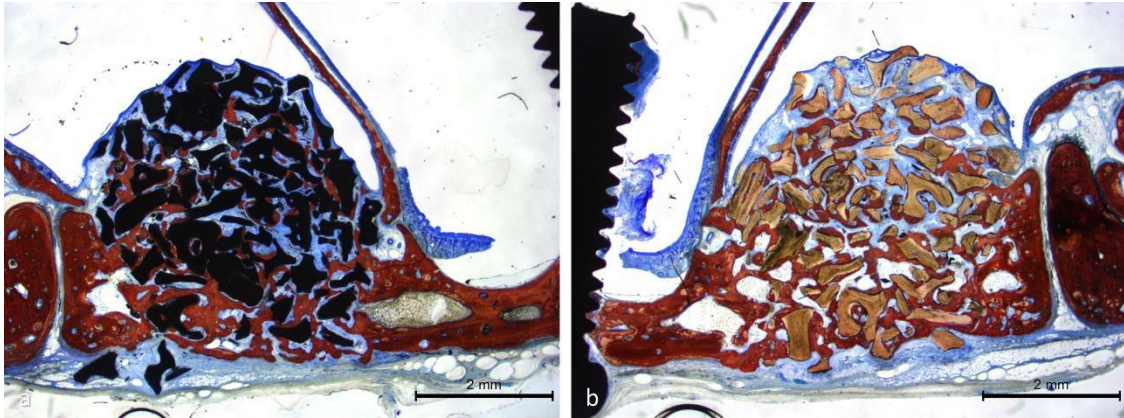


Figura 7: Fotomicrografia após 10 semanas de reparo em magnificação de 16x. Osso novo é encontrado em todas as regiões examinadas no lado **(a)** Cerabone e **(b)** Bio-Oss. As lâminas foram coradas em azul de Stevanel e vermelho de alizarina.

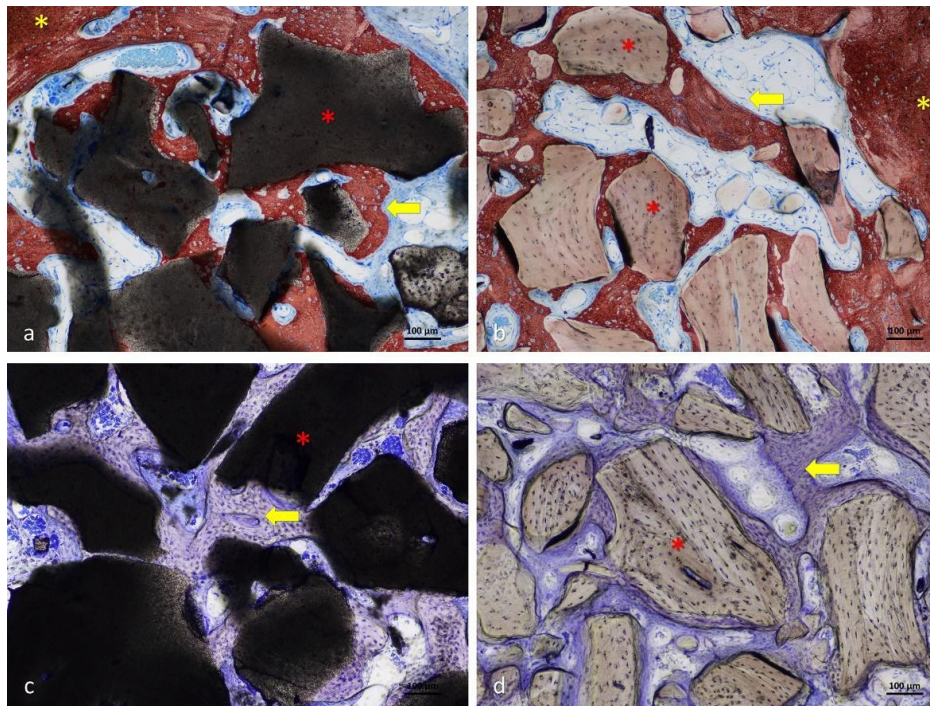


Figura 8: Fotomicrografia após 10 semanas de reparo em magnificação de 100x. Osso novo incorporado a grânulos em ambos os biomateriais e formando pontes que interconectam os grânulos. **(a e c)** Grânulos de Cerabone e **(b e d)** grânulos de Bio-Oss. **(a e b)** Foram corados com azul de Stevanel e vermelho de alizarina, enquanto **(c e d)** foi corado com azul de toluidina.

4.2 Avaliação histomorfométrica

Após 2 semanas de reparo (Tabela 1), o IBN estava quase ausente, de modo que tanto o osso novo quanto às frações ósseas totais foi de 0,7% e 0,3% para os grupos Bio-Oss e Cerabone, respectivamente ($P = 0,098$). A fração residual do

enxerto foi de 43,4% para o grupo Bio-Oss e 48,8% para o grupo Cerabone (P = 0,037).

O osso novo estava localizado principalmente próximo às paredes ósseas do seio (Tabela 2). Uma ligeira tendência para maior formação de osso novo foi observada no grupo Bio-Oss em comparação com o grupo Cerabone em todas as regiões. A região da submucosa estava virtualmente desprovida de osso novo em ambos os grupos. Nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi observada considerando as diversas regiões.

Após 10 semanas de cicatrização (Tabela 1), pequenas frações de IBN foram encontradas no grupo Cerabone (1,3%). O osso total foi encontrado em proporções de 20,0% no grupo Bio-Oss e 17,2% no grupo Cerabone (P = 0,162).

Tabela 1: Porcentagem de osso novo e enxerto remanescente dentro da área elevada total. P<0,05.

Time point	Grafting material	New bone, %			P value	IBN, %		
		Mean ± SD	Median (25%; 75%)			Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value
2 weeks	Bio-Oss	0.7 ± 0.8	0.4 (0.2; 0.6)	0.098	0.0 ± 0.0	0.0 (0.0; 0.0)	NA	
	Cerabone	0.3 ± 0.2	0.3 (0.1; 0.4)		0.0 ± 0.1	0.0 (0.0; 0.0)		
10 weeks	Bio-Oss	20.0 ± 4.3	21.4 (18.1; 22.1)	0.041	0.0 ± 0.0	0.0 (0.0; 0.0)	NA	
	Cerabone	15.8 ± 4.0	14.5 (13.8; 19.6)		1.3 ± 0.6	1.5 (1.2; 1.5)		

Time point	Grafting material	Total bone, %			P value	Residual graft, %		
		Mean ± SD	Median (25%; 75%)			Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value
2 weeks	Bio-Oss	0.7 ± 0.8	0.4 (0.2; 0.6)	0.159	43.4 ± 6.2	45.6 (40.0; 47.6)	0.037	
	Cerabone	0.3 ± 0.3	0.3 (0.1; 0.5)		48.8 ± 4.3	50.0 (49.2; 51.5)		
10 weeks	Bio-Oss	20.0 ± 4.3	21.4 (18.1; 22.1)	0.162	36.4 ± 4.3	36.4 (35.0; 38.2)	0.846	
	Cerabone	17.2 ± 4.3	15.8 (14.1; 21.1)		35.3 ± 10.5	39.7 (33.5; 41.5)		

Tabela 2: Porcentagem de osso total após 2 semanas de reparo. Considerando todas as regiões da área elevada. P<0,05.

Grafting material	Full augmented area			Next-to-window			Central		
	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value
Bio-Oss	0.7 ± 0.8	0.4 (0.2; 0.6)	0.159	0.3 ± 0.5	0.0 (0.0; 0.4)	0.250	0.3 ± 0.8	0.0 (0.0; 0.0)	0.750
Cerabone	0.3 ± 0.3	0.3 (0.1; 0.5)		0.0 ± 0.0	0.0 (0.0; 0.0)		0.1 ± 0.1	0.0 (0.0; 0.0)	

Grafting material	Submucosa			Lateral wall			Medial wall		
	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value
Bio-Oss	0.0 ± 0.0	0.0 (0.0; 0.0)	1.000	1.0 ± 1.2	0.8 (0.0; 1.3)	0.231	1.7 ± 2.2	0.5 (0.1; 2.6)	0.214
Cerabone	0.0 ± 0.0	0.0 (0.0; 0.0)		0.4 ± 0.5	0.2 (0.0; 0.7)		1.0 ± 1.3	0.3 (0.0; 1.7)	

O enxerto residual diminuiu em relação ao período de reparo anterior para 36,4% e 35,3% ($P = 0,846$) nos grupos Bio-Oss e Cerabone, respectivamente (Gráfico 1).

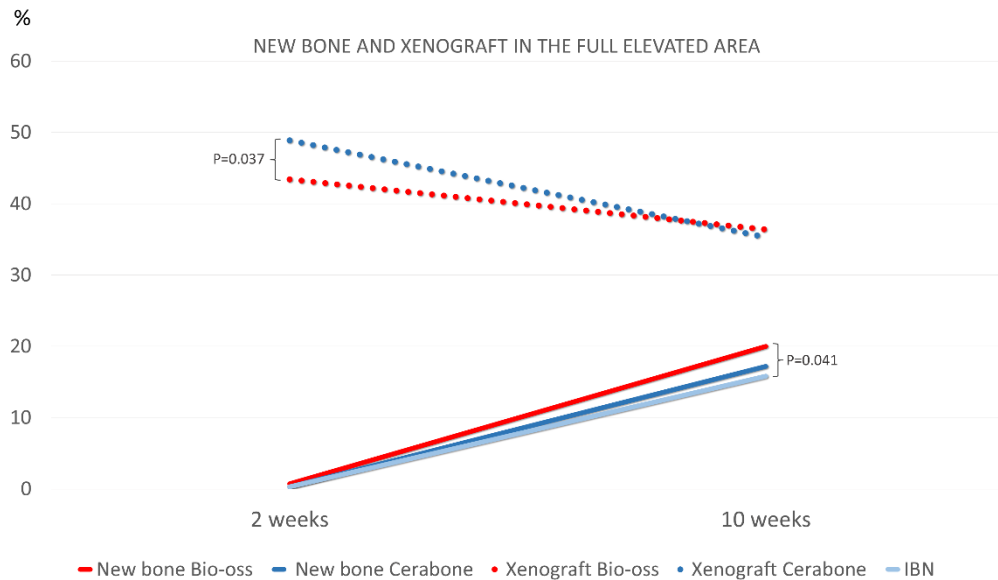


Gráfico 1: Formação de osso novo e reabsorção de enxerto xenógeno entre 2 e 10 semanas de reparo

Em ambos os grupos, as diferenças entre os períodos nos percentuais de osso total e enxerto residual foram estatisticamente significativas ($P < 0,05$). Em ambos os grupos, as regiões que apresentaram maior quantidade de osso novo foram as próximas à janela, seguidas daquelas próximas às paredes ósseas do seio (Tabela 3). Nessas regiões, a porcentagem total de osso foi maior no grupo Bio-Oss; no entanto, apenas a diferença na região da parede próxima à janela foi estatisticamente significativa ($P = 0,018$). A menor porcentagem de osso novo foi encontrada nas regiões da submucosa, seguida pela região central.

Tabela 3: Porcentagem de osso novo após 10 semanas de reparo. Considerando todas as regiões da área elevada. $P < 0,05$.

Grafting material	Full elevated area			Next-to-window			Central		
	Mean \pm SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean \pm SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean \pm SD	Median (25%; 75%)	P value
Bio-Oss	20.0 \pm 4.3	21.4 (18.1; 22.1)	0.162	31.5 \pm 8.1	32.4 (28.0; 33.7)	0.018	13.8 \pm 8.3	13.4 (7.8; 21.6)	0.585
Cerabone	17.2 \pm 4.3	15.8 (14.1; 21.1)		21.9 \pm 7.8	22.9 (21.0; 24.6)		12.2 \pm 5.1	12.8 (8.6; 15.3)	

Grafting material	Submucosa			Lateral wall			Medial wall		
	Mean \pm SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean \pm SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean \pm SD	Median (25%; 75%)	P value
Bio-Oss	6.9 \pm 6.1	5.4 (3.0; 9.6)	0.112	22.1 \pm 10.5	21.2 (15.7; 28.6)	0.529	25.7 \pm 6.8	27.0 (21.6; 29.1)	0.242
Cerabone	9.7 \pm 5.6	11.5 (4.7; 13.6)		19.4 \pm 8.5	18.6 (14.8; 25.4)		22.6 \pm 8.3	24.3 (18.8; 29.7)	

4.3 Avaliação microtomográfica

A avaliação foi realizada em dois diferentes limites de níveis de cinza para identificar tecido ósseo de enxerto ósseo xenógeno representados de: 60 a 80 e 70 a 100.

Após 2 semanas de reparo, o volume do tecidual no espaço elevado foram de $78,52 \pm 8,89 \text{ mm}^3$ e $80,44 \pm 13,12 \text{ mm}^3$ para os grupos Bio-Oss e Cerabone, respectivamente ($P = 0,208$) (Figura9).

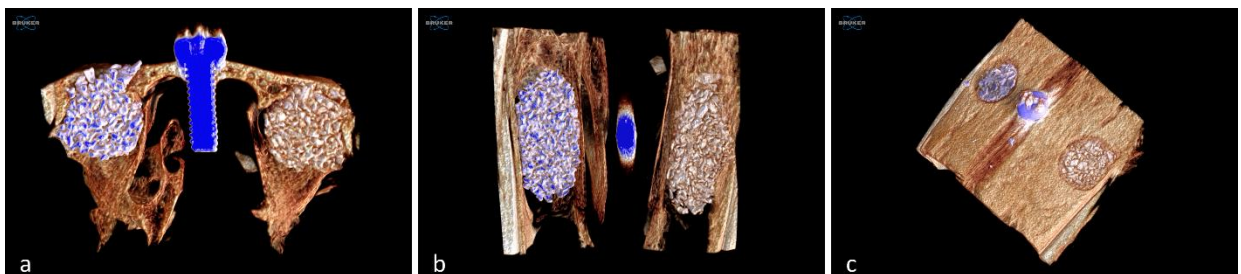


Figura 9: Imagens 3D de microtomografia representando o reparo no seio maxilar após 2 semanas. (a) Vista coronal; (b) do seio; (c) do osso nasal. O biomaterial Cerabone está a esquerda enquanto Bio-Oss a direita da imagem.

O nível de cinza de 60 a 80 rendeu $14,48\% \pm 2,29\%$ e $9,79\% \pm 1,27\%$ ($P < 0,0001$) de osso novo nos grupos Bio-Oss e Cerabone, respectivamente. Aplicando um nível de cinza de 70 a 100, as respectivas proporções de osso novo foram $20,35\% \pm 3,37\%$ e $13,60\% \pm 2,09\%$ ($P < 0,0001$) (Gráfico 2).

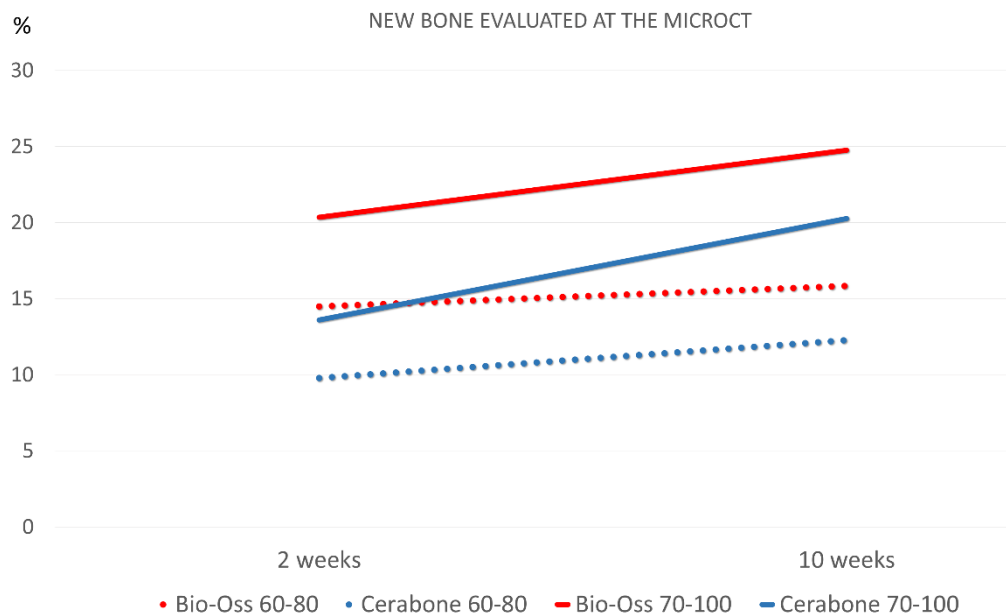


Gráfico 2: Porcentagem de osso novo avaliado através de análise microtomográfica utilizando diferentes níveis de cinza: 60 a 80 e 70 a 100.

Após 10 semanas de reparo, os volumes teciduais nos espaços elevados foram de $84,49 \pm 9,78 \text{ mm}^3$ e $92,96 \pm 12,0 \text{ mm}^3$ para os grupos Bio-Oss e Cerabone, respectivamente ($P = 0,057$). O nível de cinza de 60 a 80 revelou $15,83\% \pm 1,82\%$ e $12,28\% \pm 0,96\%$ ($P < 0,0001$) de osso novo nos grupos Bio-Oss e Cerabone, respectivamente. Aplicando um nível de cinza de 70 a 100, $24,76\% \pm 2,50\%$ foi registrado no grupo Bio-Oss e $20,26\% \pm 1,57\%$ no grupo Cerabone ($P < 0,0001$) (Figura 10).

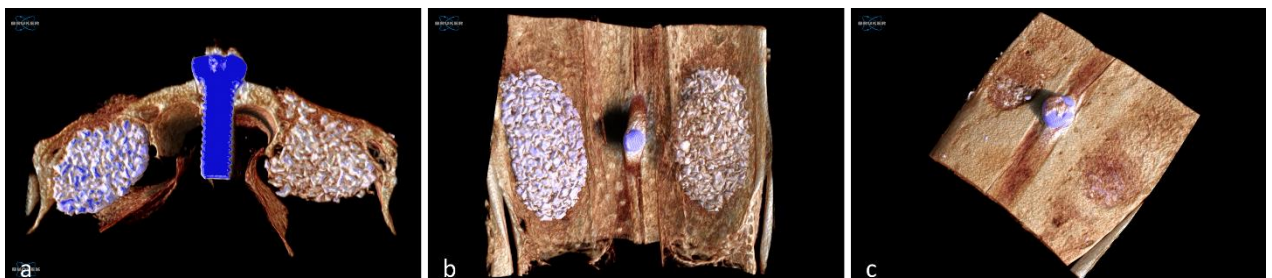


Figura 10: Imagens 3D de microtomografia representando o reparo no seio maxilar após 10 semanas. (a) Vista coronal; (b) do seio; (c) do osso nasal. O biomaterial Cerabone está a esquerda enquanto Bio-Oss a direita da imagem.

4.4 Correlação entre análise histológica e microtomográfica em 10 semanas

Aplicando um nível de cinza de 60 a 80 para avaliação do tecido ósseo, uma correlação positiva fraca para o grupo Bio-Oss (0,091; $P = 0,811$) e uma correlação negativa fraca para o grupo Cerabone (-0,333; $P = 0,349$) foram encontradas.

Usando um nível de cinza de 70 a 100, foi encontrada uma correlação positiva forte para o grupo Bio-Oss (0,709; $P = 0,027$) e uma correlação positiva fraca para o grupo Cerabone (0,212; $P = 0,560$).

5. *DISCUSSÃO*

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo comparar o reparo sequencial de seios maxilares enxertados com dois substitutos ósseos xenogênicos diferentes sinterizados em baixa ou alta temperatura. Após 10 semanas de reparo, a avaliação histológica demonstrou que uma tendência à maior formação óssea foi encontrada no grupo Bio-Oss em comparação com o grupo Cerabone; no entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa. Em ambos os grupos, os maiores percentuais de osso novo foram observados nas regiões próximas às paredes ósseas e à osteotomia.

No grupo Cerabone, várias partículas de enxerto apresentaram regiões escuras com sombras embaçadas que escondiam os tecidos duros e moles. Esses tecidos foram mostrados mais claramente ao microscópio ao superexpor a imagem à luz enquanto, ao ajustar o foco, não houve melhora na identificação. Esse método possibilitou a identificação de osso novo escondido pelas sombras e foi ilustrado em outros artigos em que o beta tricálcio fosfato bifásico/hidroxiapatita (β -TCP/HA) foi utilizado para o levantamento do assoalho do seio maxilar em ovelhas (PERINI et al., 2020) e coelhos (TANAKA et al., 2020) e recentemente em espécimes de biópsia humana para revelar osso coberto por sombras ao redor de Cerabone (KOTSU et al 2022). A quantidade total de osso relatada representou a soma de osso novo fora das sombras escuras e aquele coberto por essas sombras (IBN). A estrutura do IBN recorda a de uma “rede de polímeros interpenetrantes” (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY) e, conseqüentemente, um nome semelhante foi adotado.

Após 2 semanas de reparo, a porcentagem de osso novo na área totalmente elevada foi < 1% em ambos os grupos. A inclusão de um período precoce de cicatrização na análise do presente estudo possibilitou avaliar as diferenças nas regiões próximas à origem do novo osso e, ao mesmo tempo, possibilitou avaliar as variações dimensionais ao longo do tempo. Após 2 semanas de reparo, o edema pós-cirúrgico que ocorreu após o aumento do assoalho do seio maxilar (KAWAKAMI et al 2018; KAWAKAMI et al 2019; KATO et al., 2021; SAKUMA et al., 2020) parecia estar resolvido. Os processos de reabsorção ainda estavam em fase inicial, resultando em pouco efeito nas mudanças dimensionais. Durante este período de reparo em ambos os grupos, o osso foi formado a partir das paredes laterais do seio maxilar enquanto,

na área da submucosa, nenhum osso novo foi encontrado. Isso está de acordo com vários outros relatos que demonstraram a ausência de participação da mucosa sinusal na formação óssea durante este período inicial de cicatrização (SCALA et al., 2012; SCALA et al., 2010; IIDA et al 2017; OMORI et al., 2018).

Após 10 semanas, as porcentagens de osso novo aumentaram em ambos os grupos em todas as regiões incluídas nas análises. Nesse período de reparo, a porcentagem de osso novo foi de 20,0% no grupo Bio-Oss e 17,2% no grupo Cerabone. Uma comparação de resultados de reparo ósseo entre Bio-Oss e Cerabone após o levantamento do assoalho do seio também foi realizada em um estudo clínico (MAHESH et al., 2020). Amostras de biópsia foram coletadas após 6 meses do procedimento de levantamento de seio maxilar e a proporção de osso novo foi de 41,4% no grupo Bio-Oss e 39,2% no grupo Cerabone; no entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa (MAHESH et al., 2020). Essas porcentagens de osso novo foram aproximadamente o dobro para ambos os grupos em comparação com o presente estudo. A diferença percentual pode estar relacionada ao modelo diferente utilizado, mas também ao fato de que os espécimes de biópsia no estudo animal abrangeram todas as regiões do seio, incluindo aquelas com muito pouco osso, como a subjacente à submucosa. No estudo anterior, apenas a região próxima à base do seio foi incluída na análise (MAHESH et al., 2020), ou seja, mais próxima de uma importante fonte de osso novo (KAWAKAMI et al 2018; KAWAKAMI et al 2019).

Em outro estudo clínico, a análise realizada em biópsia colhidos após 8 meses do levantamento do seio maxilar, revelou maiores proporções de osso novo no grupo Cerabone (29,1%) em comparação com o grupo Bio-Oss (24,6%) (PANAGIOTOU et al., 2015). Novamente, a diferença não foi estatisticamente significativa.

No presente estudo, em ambos os grupos, as maiores quantidades de osso novo estavam localizadas próximas às paredes ósseas e à osteotomia. Ambos os biomateriais permitiram a formação de novo osso e, após 2 semanas, os primeiros sinais de incorporação dos grânulos vizinhos já eram observados próximos às paredes ósseas. Após 10 semanas, a incorporação dos grânulos foi observada em todas as regiões. Este evento foi descrito em outros estudos experimentais (CANEVA et al., 2017; BUSENLECHNER et al 2009; GODOY et al., 2021).

Em um experimento de aumento de assoalho sinusal em coelhos, os eventos sequenciais de contato osso-enxerto nos grânulos de DBBM foram analisados após 7, 14, 20 e 40 dias de reparo (CANEVA et al., 2017). Após 7 dias, pequenas quantidades de osso foram encontradas próximas às paredes ósseas, enquanto os grânulos de DBBM estavam cercados por tecido mole contendo fibras e células semelhantes a fibroblastos dispostas em camadas em contato direto com a superfície do biomaterial e, após 14 dias, vários grânulos de DBBM estavam cobertos por osso recém-formado; entretanto, a maioria estava circundada por tecidos densos, semelhantes aos observados após 7 dias de reparo, e as regiões entre os grânulos eram ocupadas por tecido frouxo, pobre em células, mas rico em vasos (CANEVA et al., 2017).

Nos períodos seguintes, grânulos adicionais foram envolvidos por osso neoformado, e as superfícies não cobertas por osso apresentaram tecidos densos (CANEVA et al., 2017). As regiões, incluindo aquelas entre grânulos, inicialmente ocupadas por tecidos frouxos, sofreram uma transformação em medula óssea primitiva (CANEVA et al., 2017).

No presente estudo, após 10 semanas de reparo, o osso novo em toda a área do grupo Bio-Oss atingiu uma proporção de 20,0%. Esse resultado é semelhante ao relatado em outro estudo em que grânulos de Bio-Oss foram tratados com plasma de argônio ou deixados sem tratamento antes de serem usados para preencher o espaço subantral em coelhos (HIROTA et al., 2020). As porcentagens de osso novo após 10 semanas foram de 23,5% no grupo de plasma e 21,3% no grupo não tratado. As análises histológicas também foram realizadas na parede óssea e regiões centrais dos seios (HIROTA et al., 2020). A proporção de osso novo no grupo não tratado com plasma de argônio foi de 26,3% na região da parede óssea e 13,2% nas regiões centrais (HIROTA et al., 2020). Esses dados são consistentes com os do presente estudo, com a proporção de osso novo sendo de aproximadamente 22,0% a 26,0% na região da parede óssea e 13,8% na região central.

Em ambos os grupos do presente estudo, a região da submucosa apresentou menor quantidade de osso novo em relação às demais regiões examinadas, sendo 6,9% e 9,7% nos grupos Bio-Oss e Cerabone, respectivamente. Outros experimentos semelhantes de levantamento de seio em coelhos relataram dados sobre a formação óssea nesta região (AMARI et al., 2020; MASUDA et al., 2019; SCALA et al., 2020;

SCALA et al., 2016; FAVERO et al., 2016). A presença de osso novo subjacente à mucosa sinusal não pode excluir sua contribuição para a formação óssea; no entanto, se essa contribuição existe, ela é limitada. Também é necessário considerar que várias perfurações da mucosa sinusal foram observadas em relação às partículas do biomaterial em ambos os grupos. Foi demonstrado em um modelo de coelho que a presença de perfurações da mucosa sinusal compromete a formação óssea nas regiões adjacentes dentro do seio (PAIK et al., 2022).

A diferença percentual entre 2 e 10 semanas de reparo foi de 7,0% para Bio-Oss e 13,5% para Cerabone. Isso significa que parte do biomaterial foi reabsorvido ou perdido pela osteotomia ou pela mucosa sinusal. De fato, várias zonas osteoclásticas foram observadas ao redor de ambos os biomateriais no período de avaliação de 2 semanas, enquanto que após 10 semanas, células do tipo osteoclasto raramente foram observadas. Essa observação concorda com outros relatos que mostraram uma porcentagem progressivamente decrescente de osteoclastos dentro do espaço aumentado ao longo do tempo (IIDA et al., 2017; OMORI et al., 2018).

Os dois enxertos ósseos esponjosos bovinos usados no presente experimento como material de preenchimento para o levantamento do assoalho do seio maxilar foram processados em diferentes temperaturas, ou seja, 300°C para Bio-Oss e 1200°C para Cerabone. O processo realizado em alta temperatura produz partículas macroporosas com maior cristalinidade que podem resultar em reabsorção mais lenta do enxerto, e diminui a microporosidade da superfície, o que também pode reduzir a osteocondutividade (BLOCK et al., 2020; BLOCK et al., 2019; RAMIREZ et al 2017). No presente estudo, no entanto, apesar do uso de volumes semelhantes de biomaterial em todos os seios, foram encontrados volumes ligeiramente maiores após 10 semanas em comparação com 2 semanas de cicatrização. Isso, por sua vez, significa que os volumes foram mantidos ao longo do tempo ou até aumentados, talvez por aposição óssea.

A microtomografia apresentou maiores porcentagens de osso novo no grupo Bio-Oss em comparação ao grupo Cerabone ($P > 0,0001$). Os dados obtidos da análise microCT não estavam completamente de acordo com os da análise histológica, especialmente para o período de 2 semanas. Essas diferenças podem ser atribuídas ao fato de que a histologia é uma análise bidimensional que representa apenas uma porção central e limitada do seio que inclui a osteotomia. A análise de

microCT avalia todo o volume que inclui também regiões localizadas distal e mesialmente à osteotomia, em contato com o osso nasal, que representam mais uma fonte de formação óssea; entretanto, outro aspecto que deve ser considerado é que a análise de microTC pode dificultar a discriminação entre osso e o enxerto ósseo xenógeno, gerando resultados contraditórios em relação às avaliações histológicas, principalmente nos períodos mais precoces de reparo (IIDA et al., 2020; IIDA et al., 2018). De fato, três das quatro correlações avaliadas entre a porcentagem óssea após 10 semanas nos grupos Bio-Oss e Cerabone foram fracas, enquanto apenas para o grupo Bio-Oss aplicando um nível de cinza de 70 a 100 foi fortemente positivo.

No que diz respeito às limitações do presente estudo, devem ser mencionadas as sombras escuras em forma de nevoa presentes em algumas regiões dos grânulos de Cerabone. Este evento, talvez devido à alta porosidade do biomaterial, às características da mancha ou à lenta degradação do biomaterial (IEZZI et al 2017), pode obstruir a identificação de osso novo e diminuir a porcentagem de osso novo detectado com Cerabone. O modelo utilizado representa outra limitação do estudo considerando as dimensões do seio e a menor espessura da mucosa do seio em comparação com humanos (IIDA et al., 2017). Além disso, o reparo em coelhos mostrou ser mais rápida em comparação com humanos (BOTTICELLI et al., 2017); assim, quaisquer inferências sobre os seres humanos devem ser tomadas com cautela.

6. CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O presente estudo ilustrou que ambos os biomateriais forneceram condições que permitiram o crescimento ósseo dentro do espaço elevado e confirmou que ambos os biomateriais são adequados para serem usados como materiais de enxerto para aumento do assoalho do seio maxilar. A superexposição à luz do microscópio na preparação histológica pode ajudar a identificar os tecidos velados pelas sombras escuras que cercam as partículas ósseas de Cerabone.

7. REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

1. Pjetursson BE, Tan WC, Zwahlen M, Lang NP. A systematic review of the success of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation. *J Clin Periodontol* 2008;35(8, suppl):216–240.
2. Asai S, Shimizu Y, Ooya K. Maxillary sinus augmentation model in rabbits: Effect of occluded nasal ostium on new bone formation. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:405–409.
3. Xu H, Shimizu Y, Asai S, Ooya K. Grafting of deproteinized bone particles inhibits bone resorption after maxillary sinus floor elevation. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:126–133.
4. 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;27:1106–1122.
5. Ellegaard B, Kølsen-Petersen J, Baelum V. Implant therapy involving maxillary sinus lift in periodontally compromised patients. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:305–315.
6. Lundgren S, Andersson S, Gualini F, Sennerby L. Bone reformation with sinus membrane elevation: A new surgical technique for maxillary sinus floor augmentation. *Clin Implant Dent Relat Res* 2004;6:165–173.
7. Ellegaard B, Baelum V, Kølsen-Petersen J. Non-grafted sinus implants in periodontally compromised patients: A time-to-event analysis. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:156–164.
8. Scala A, Botticelli D, Faeda RS, Rangel IG Jr, de Oliveira JA, Lang NP. Lack of influence of the Schneiderian membrane in forming new bone apical to implants simultaneously installed with sinus floor elevation: An experimental study in monkeys. *Clin Oral Implants Res* 2012;23:175–181.
9. Scala A, Botticelli D, Rangel IG Jr, de Oliveira JA, Okamoto R, Lang NP. Early healing after elevation of the maxillary sinus floor applying a lateral access: A histological study in monkeys. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:1320–1326.

10. Cricchio G, Palma VC, Faria PE, et al. Histological findings following the use of a space-making device for bone reformation and implant integration in the maxillary sinus of primates. *Clin Implant Dent Relat Res* 2009;11(suppl 1:e14–e22.
11. Cricchio G, Palma VC, Faria PE, et al. Histological outcomes on the development of new space-making devices for maxillary sinus floor augmentation. *Clin Implant Dent Relat Res* 2011;13:224–230.
12. Schweikert M, Botticelli D, de Oliveira JA, Scala A, Salata LA, Lang NP. Use of a titanium device in lateral sinus floor elevation: An experimental study in monkeys. *Clin Oral Implants Res* 2012;23: 100–105.
13. Johansson LÅ, Isaksson S, Adolfsson E, Lindh C, Sennerby L. Bone regeneration using a hollow hydroxyapatite space-maintaining device for maxillary sinus floor augmentation--A clinical pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2012;14:575–584.
14. Klijn RJ, Meijer GJ, Bronkhorst EM, Jansen JA. Sinus floor augmentation surgery using autologous bone grafts from various donor sites: A meta-analysis of the total bone volume. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16:295–303.
15. De Santis E, Lang NP, Ferreira S, Garcia IR Jr, Caneva M, Botticelli D. Healing at implants installed concurrently to maxillary sinus floor elevation with Bio-Oss® or autologous bone grafts. A histo-morphometric study in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2017;28:503–511.
16. Scala A, Lang NP, de Carvalho Cardoso L, Pantani F, Schweikert M, Botticelli D. Sequential healing of the elevated sinus floor after applying autologous bone grafting: An experimental study in minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2015;26:419–425.
17. Clavero J, Lundgren S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: Comparison of donor site morbidity and complications. *Clin Implant Dent Relat Res* 2003;5:154–160.
18. Jensen T, Schou S, Svendsen PA, et al. Volumetric changes of the graft after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios: A radiographic study in minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2012;23:902–910.

19. Sbordone L, Levin L, Guidetti F, Sbordone C, Glikman A, Schwartz- Arad D. Apical and marginal bone alterations around implants in maxillary sinus augmentation grafted with autogenous bone or bovine bone material and simultaneous or delayed dental implant position- ing. *Clin Oral Implants Res* 2011;22:485–491.
20. Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Max- illary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012;41:114–120.
21. Manfro R, Fonseca FS, Bortoluzzi MC, Sendyk WR. Compara- tive, histological and histomorphometric analysis of three anorganic bovine xenogenous bone substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic. *J Maxillofac Oral Surg* 2014;13:464–470.
22. Moon JW, Sohn DS, Heo JU, Kim JS. Comparison of two kinds of bovine bone in maxillary sinus augmentation: A histomorphometric study. *Implant Dent* 2015;24:19–24.
23. 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 longi- tudinal study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2016;18:926–936.
24. Caneva M, Lang NP, Rangel IG Jr, et al. Sinus mucosa elevation using Bio- Oss® or Gingostat® collagen sponge: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2017;28:e21–e30.
25. 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;24:57–64.
26. Hirota A, Yamada Y, Canullo L, Xavier SP, Baba S. Bioactivation of bovine bone matrix using argon plasma: An experimental study for sinus augmentation in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2020;35:731–738.
27. Busenlechner D, Huber CD, Vasak C, Dobsak A, Gruber R, Watzek G. Sinus augmentation analysis revised: The gradient of graft consolida- tion. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:1078–1083.

28. Godoy EP, Alccayhuaman KAA, Botticelli D, et al. Osteoconductivity of bovine xenograft granules of different sizes in sinus lift: A histomorphometric study in rabbits. *Dent J (Basel)* 2021;9:61.
29. Galindo-Moreno P, Hernández-Cortés P, Aneiros-Fernández J, et al. Morphological evidences of Bio-Oss® colonization by CD44-positive cells. *Clin Oral Implants Res* 2014;25:366–371.
30. Riachi F, Naaman N, Tabarani C, et al. Influence of material properties on rate of resorption of two bone graft materials after sinus lift using radiographic assessment. *Int J Dent* 2012;2012:737262.
31. Mahesh L, Mascarenhas G, Bhasin MT, Guirado C, Juneja S. Histological evaluation of two different anorganic bovine bone matrixes in lateral wall sinus elevation procedure: A retrospective study. *Natl J Maxillofac Surg* 2020;11:258–262.
32. Zahedpasha A, Ghassemi A, Bijani A, Haghanifar S, Majidi MS, Ghorbani ZM. Comparison of bone formation after sinus membrane lifting without graft or using bone substitute “histologic and radiographic evaluation”. *J Oral Maxillofac Surg* 2021;79:1246–1254.
33. Tawil G, Barbeck M, Unger R, Tawil P, Witte F. Sinus floor elevation using the lateral approach and window repositioning and a xenogeneic bone substitute as a grafting material: A histologic, histomorphometric, and radiographic analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2018;33:1089–1096.
34. Imai H, Lang NP, Ferri M, Hirota A, Apaza Alccayhuaman KA, Botticelli D. Tomographic assessment on the influence of the use of a collagen membrane on dimensional variations to protect the antrostomy after maxillary sinus floor augmentation: A randomized clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2020;35:350–356.
35. Perić Kačarević Z, Kavehei F, Houshmand A, et al. Purification processes of xenogeneic bone substitutes and their impact on tissue reactions and regeneration. *Int J Artif Organs* 2018;41:789–800.
36. Laschke MW, Witt K, Pohlemann T, Menger MD. Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: In vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;82:494–505.

37. Huber FX, Berger I, McArthur N, et al. Evaluation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste and a solid hydroxyapatite ceramic for the treatment of critical size bone defects (CSD) in rabbits. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19:33–38.
38. Catros S, Sandgren R, Pippenger BE, Fricain JC, Herber V, El Chaar E. A novel xenograft bone substitute supports stable bone formation in circumferential defects around dental implants in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2020;35:1122–1131.
39. Shakir M, Jolly R, Khan AA, et al. Resol based chitosan/nano-hydroxyapatite nanoensemble for effective bone tissue engineering. *Carbohydr Polym* 2018;179:317–327.
40. Kumlien J, Schiratzki H. Blood flow in the rabbit sinus mucosa during experimentally induced chronic sinusitis. Measurement with a diffusible and with a non-diffusible tracer. *Acta Otolaryngol* 1985;99:630–636.
41. Kennedy DW, Shaalan H. Reevaluation of maxillary sinus surgery: Experimental study in rabbits. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1989;98:901–906.
42. Trajkovski B, Jaunich M, Müller WD, Beuer F, Zafiropoulos GG, Houshmand A. Hydrophilicity, viscoelastic, and physicochemical properties variations in dental bone grafting substitutes. *Materials (Basel)* 2018;11:215.
43. Costa MM, Botticelli D, Moses O, et al. Maxillary sinus augmentation using ceramic alloplastic granules or paste: An experimental study in rabbits. *Dent J (Basel)* 2021;9:65.
44. Lee JH, Yi GS, Lee JW, Kim DJ. Physicochemical characterization of porcine bone-derived grafting material and comparison with bovine xenografts for dental applications. *J Periodontal Implant Sci* 2017;47:388–401.
45. Schroeder HE, Münzel-Pedrazzoli S. Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue. Morphometric model, tissue sampling and test of stereologic procedures. *J Microsc* 1973;99:301–329.
46. Perini A, Ferrante G, Sivoletta S, Velez JU, Bengazi F, Botticelli D. Bone plate repositioned over the antrostomy after sinus floor elevation: An experimental study in sheep. *Int J Implant Dent* 2020;6:11.

47. Tanaka K, Botticelli D, Canullo L, Baba S, Xavier SP. New bone ingrowth into β -TCP/HA graft activated with argon plasma: A histomorphometric study on sinus lifting in rabbits. *Int J Implant Dent* 2020;6:36.
48. Kotsu M, Apaza Alccayhuaman KA, Ferri M, et al. Osseointegration at implants installed in composite bone. A histological randomized clinical trial on sinus floor elevation. *J Funct Biomater* 2022;13:22.
49. International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of Chemical Terminology (the "Gold Book"), ed 2. <https://goldbook.iupac.org/> Accessed April 30 2022.
50. Kawakami S, Lang NP, Iida T, Ferri M, Apaza Alccayhuaman KA, Botticelli D. Influence of the position of the antrostomy in sinus floor elevation assessed with cone-beam computed tomography: A randomized clinical trial. *J Investig Clin Dent* 2018;9:e12362.
51. Kawakami S, Lang NP, Ferri M, Apaza Alccayhuaman KA, Botticelli D. Influence of the height of the antrostomy in sinus floor elevation assessed by cone beam computed tomography – A randomized clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2019;34:223–232.
52. Kato S, Omori Y, Kanayama M, et al. Sinus mucosa thickness changes and ostium involvement after maxillary sinus floor elevation in sinus with septa. A cone beam computed tomography study. *Dent J (Basel)* 2021;9:82.
53. Sakuma S, Ferri M, Imai H, et al. Involvement of the maxillary sinus ostium (MSO) in the edematous processes after sinus floor augmentation: a cone-beam computed tomographic study. *Int J Implant Dent* 2020;6:35
54. 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;28:1567–1576.
55. 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;29:821–834.

56. Panagiotou D, Özkan Karaca E, Dirikan İpçi Ş, Çakar G, Olgaç V, Yılmaz S. Comparison of two different xenografts in bilateral sinus augmentation: Radiographic and histologic findings. *Quintessence Int* 2015;46:611–619.
57. Amari Y, Botticelli D, Apaza Alccayhuaman KA, Hirota A, Silva ER, Xavier SP. The influence on healing of bony window elevated inward in the sinus cavity as cortical bone graft: A histomorphometric study in rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2020;35:879–887.
58. 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;34:819–827.
59. Scala A, Viña-Almunia J, Carda C, et al. Sequential healing of the elevated sinus floor with different size of antrostomy: A histomorphometric study in rabbits. *Oral Maxillofac Surg* 2020;24:403–410.
60. Scala A, Lang NP, Urbizo Velez J, 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;27:1454–1461.
61. Favero V, Lang NP, Canullo L, Urbizo Velez J, Bengazi F, Botticelli D. Sinus floor elevation outcomes following perforation of the Schneiderian membrane. An experimental study in sheep. *Clin Oral Implants Res* 2016;27:233–240.
62. Paik JW, Cha JK, Song YW, Thoma DS, Jung RE, Jung UW. Effect of Schneiderian membrane integrity on bone formation in sinus augmentation: An experimental study in rabbits. *J Clin Periodontol* 2022;49:76–83.
63. Block MS. Does the use of high-temperature-processed xenografts for ridge augmentation result in ridge width stability over time? *J Oral Maxillofac Surg* 2020;78:1717–1725.
64. Block MS. The processing of xenografts will result in different clinical responses. *J Oral Maxillofac Surg* 2019;77:690–697.

65. Ramírez Fernández MP, Mazón P, Gehrke SA, Calvo-Guirado JL, De Aza PN. Comparison of two xenograft materials used in sinus lift procedures: Material characterization and in vivo behavior. *Materials (Basel)* 2017;10:623.
66. Iida T, Silva ER, Lang NP, Apaza Alccayhuaman KA, Botticelli D, Xavier SP. Histological and micro-computed tomography evaluations of newly formed bone after maxillary sinus augmentation using a xenograft with similar density and mineral content of bone: An experimental study in rabbits. *Clin Exp Dent Res* 2018;4: 284–290.
67. Iezzi G, Piattelli A, Giuliani A, et al. Molecular, cellular and pharmaceutical aspects of bone grafting materials and membranes during maxillary sinus-lift procedures. Part 2: Detailed characteristics of the materials. *Curr Pharm Biotechnol* 2017;18:33–44.
68. Botticelli D, Lang NP. Dynamics of osseointegration in various human and animal models – A comparative analysis. *Clin Oral Implants Res* 2017;28:742–748.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICATE CEUA – FORP/USP

We hereby certify that the project entitled “**Comparação entre between BioOss® and Cerabone® in maxillary sinus lifting. Histomorphometric and microtomographic study in rabbits.**”, Protocol nº 2019.1.113.58.1, under the responsibility of Prof. Dr. Samuel Porfírio Xavier – involving the production, maintenance and/or use of animals from the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for purposes of scientific research (or teaching) – is in accordance with the provisions of Law No. 11.794, of October 8th, 2008, Decree No. 6899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Board of Animal Experimentation Control (CONCEA), with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, and was approved in 08/04/2019.

Duration of the Project	01/09/2019 a 01/08/2020
Species/Lineage	Rabbits / New Zealand
Nº of animals	20
Weight / age	3,5- 4,5 kg / 5-6 months-old
Gender	Male
Origin	External Breeder - Taquaritinga

Ribeirão Preto, April 8th, 2019.


Prof. Dra. Anđiara De Rossi Daldegan

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA - FORP/USP

ARTIGO PUBLICADO

Maxillary Sinus Floor Augmentation with Two Different Inorganic Bovine Bone Grafts: an Experimental Study in Rabbits

Vitor FERREIRA BALAN¹, Daniele BOTTICELLI², David PEÑARROCHA-OLTRA³, Katsuhiko MASUDA⁴, Eduardo PIRES GODOY¹, Samuel Porfirio XAVIER¹

Objective: To compare the sequential healing of maxillary sinuses grafted with two different xenogeneic bone substitutes processed at either a low (300°C) or high (1200°C) temperature.

Methods: A sinus augmentation procedure was performed bilaterally in 20 rabbits and two different xenogeneic bone grafts were randomly used to fill the elevated spaces. Healing was studied after 2 and 10 weeks, in 10 rabbits during each period.

Results: After 2 weeks of healing, very small amounts of new bone were observed in both groups, and were mainly confined to close to the sinus bone walls and osteotomy edges. After 10 weeks of healing, new bone was found in all regions, with higher percentages in those close to the bone walls and to the osteotomy. In this period of healing, the proportion of new bone in the 300°C group was 20.0% ± 4.3%, and in the 1200°C group it was 17.2% ± 4.3% ($P = 0.162$). In the 1200°C group, translucent, dark fog-like shadows in regions of the grafts were hiding portions of new bone (interpenetrating bone network).

Conclusion: Both biomaterials provided conditions that allowed bone growth within the elevated space, confirming that both biomaterials are suitable to be used as a graft for sinus floor augmentation.

Key words: animal study, bone healing, histology, sinus floor augmentation, sinus membrane
Chin J Dent Res 2022;25(2):93–105; doi: 10.3290/j.cjdr.b3086337

Maxillary sinus augmentation is a widely used procedure to restore the bone volume lost in the posterior maxilla in patients who require implant-supported rehabilitation¹.

Several studies have shown that the sinus mucosa tends to return to its original position if implants or

biomaterials are not inserted into the space created by its elevation^{2,3}. To counteract the volume shrinkage, the use of biomaterials⁴, implants⁵⁻⁹ or devices¹⁰⁻¹³ has been suggested. Autogenous bone is still considered the filler of choice for sinus floor augmentation¹⁴; however, high rates of volumetric resorption of autogenous bone have been reported^{15,16}, in addition to the surgical morbidity associated with the donor bed¹⁷. Several grafting materials have been used to fill the augmented maxillary sinus, among which xenogeneic bone granules, derived from different animal species, have been studied in the literature⁴. Among the xenogeneic graft materials, a deproteinised bovine bone mineral (DBBM) processed at a low temperature (300°C) has been used in several clinical¹⁸⁻²³ and animal studies^{2,3,15,24-26}. This xenogeneic bone presents slow resorption and excellent osteoconductive properties^{24,27-29}. Another deproteinised bovine bone produced only from the pure mineral bovine bone phase and sintered at a high temperature

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

2 ARDEC Academy, Rimini, Italy.

3 Department of Stomatology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia, Valencia, Spain.

4 Department of Paediatric Dentistry, Division of Oral Infection and Disease Control, Osaka University, Osaka, Japan.

Corresponding author: Dr Daniele Botticelli, ARDEC Academy, Viale Giovanni Pascoli 67, Rimini, Italy. Tel: 39-0541393444. Email: daniele.botticelli@gmail.com

The study was supported by ARDEC Academy, Rimini, Italy. The Cerabone material was provided free of charge by Straumann Italy.

(> 1200°C) has been used for sinus floor augmentation³⁰⁻³⁵. This xenogeneic graft has also been employed in animal experiments, using different models and sites such as chambers prepared in skinfolds on the back of hamsters³⁶, critical defects in the rabbit ulna³⁷, circumferential defects around dental implants in minipigs³⁸ or critical-size calvarium defects in albino rats³⁹. An animal model using rabbits for maxillary sinus augmentation surgery has been shown to be the most appropriate for experiments, mainly due to its similarity to the human anatomy; both have wide and accessible cavity, well-defined ostium and a mucociliary system with the same characteristics^{40,41}.

A comparative clinical study of Bio-Oss (Geistlich, Wolhusen, Switzerland) and Cerabone (Botiss Biomaterials, Zossen, Germany) used in maxillary sinus augmentation surgery found that Cerabone had larger particles (1:2.7) and a less intense gradual release of calcium ions³⁰. Moreover, in a radiographic evaluation conducted after 4 years, a more pronounced volumetric loss was observed for Bio-Oss compared to Cerabone³⁰. An *in vitro* study reported a higher level of hydrophilicity for Cerabone compared to Bio-Oss⁴².

In histological analyses, maxillary sinuses of rabbits filled with DBBM presented a good amount of newly formed bone, providing maintenance of the space created within the elevated area^{2,3,24}. There are no reports in the literature involving maxillary sinus augmentation in animals that compared the results of healing using Bio-Oss and Cerabone as fillers. Thus, the aim of the present study was to compare the sequential healing of maxillary sinuses grafted with two different xenogeneic bone substitutes processed at either a low or high temperature.

Materials and methods

Ethical statements

The experimental protocol was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil on 8 April 2019 (protocol #2019.1.113.58.1). The article was written according to the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines. The Brazilian rules for animal care were followed strictly.

Animal sample

A total of 20 adult male New Zealand white rabbits weighing approximately 3.5 to 4.0 kg and aged 5 to 6 months were used in the present study following a previously published methodology⁴³.

Study design and sample calculation

A randomised split-mouth design was used to eliminate interferences between subjects in the same group. Sinus augmentation was performed bilaterally and two different bovine xenogeneic bone materials, sintered at 300°C (Bio-Oss group) or 1200°C (Cerabone group), were used to fill the two augmented spaces. Two healing periods were analysed, namely 2 and 10 weeks, with 10 animals each period.

The sample size was determined considering data from a previous study available at the time of sample size calculation²⁸, applying $\alpha = 0.05$, power = 0.8 and a correlation between measures of 0.5. Thus, for this configuration, the sample size was 10 animals per group (two groups, $n = 10$) to enable the authors to find statistical significance between the experimental groups.

Biomaterials

Bio-Oss is a DBBM with sinterisation at 300°, porosity of 75% to 80%, pores of 20 to 200 μm and a mean particle size of 0.5 to 1.0 mm⁴⁴. Cerabone, meanwhile, is formed completely by hydroxyapatite from bovine cancellous bone, with sinterisation at 1200°C, porosity of 65% to 80%, pores of 600 to 900 μm and a mean particle size of 0.5 to 1.0 mm⁴⁴.

Randomisation and allocation concealment

Randomisation between groups and periods of healing was performed electronically (randomization.com) by an author who was not involved in the selection and handling of animals and/or surgical procedures (SPX) on 5 May 2019. The treatment allocations were secured in opaque sealed envelopes and revealed to the surgeon (VFB) immediately after completion of the osteotomy and sinus mucosa elevation.

Surgical procedures

The surgical procedures were performed by one expert surgeon (VFB), preceded by injection of acepromazine maleate (1.0 mg/kg; Acepran, Vetnil, Louveira, SP, Brazil), xylazine (3.0 mg/kg; Dopaser, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brazil) and ketamine hydrochloride (50 mg/kg; Ketamin Agener, União Química Farmacêutica Nacional, Embu-Guaçú, São Paulo, Brazil). Through an incision in the nasal dorsum, the nasal bone was exposed, and osteotomies were created bilaterally to the naso-incisal suture (Fig 1a). The sinus mucosa was elevated and the subnasal spaces were randomly filled

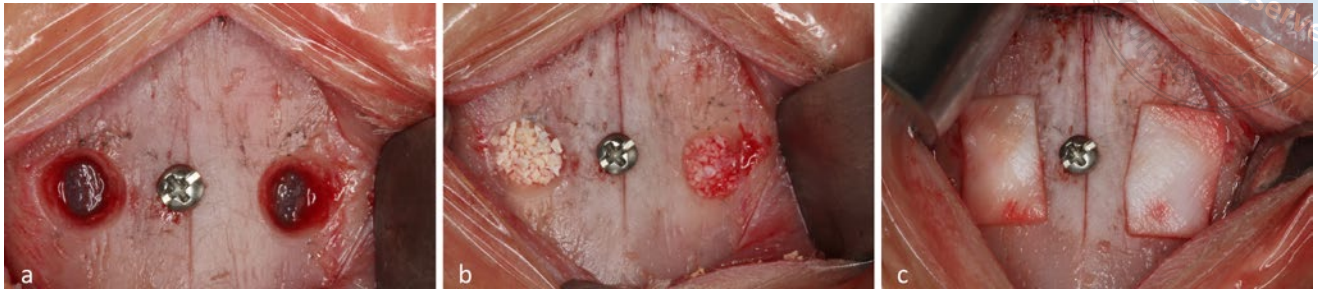


Fig 1 Clinical view of the nasal dorsum and the two osteotomies lateral to the naso-incisal suture. **(a)** Both osteotomies prepared; a small screw was placed in the naso-incisal suture between the centres of the osteotomies to assist the subsequent histological processing; **(b)** xenogeneic bone grafts placed within the elevated space: Cerabone on the left and Bio-Oss on the right; **(c)** collagen membranes placed on the osteotomies.

with similar amounts of the two biomaterials (Fig 1b). The osteotomies were subsequently covered using a collagen membrane (Bio-Gide, Geistlich; Fig 1c), and the wounds were closed with sutures.

Maintenance care

The animals were housed in individual cages placed in climatized rooms with access to food and water ad libitum. The biological functions and the wounds were monitored by veterinarians over the whole period of the experiment.

Euthanasia

The rabbits were first anaesthetised following similar procedure exposed above and then euthanised in a closed transparent acrylic box containing gas carbon dioxide (CO₂). The region of interest was harvested and fixed in 10% formaldehyde.

Microcomputed tomography (microCT) evaluations

A 1172 microcomputed tomography (microCT) system (Bruker, Kontich, Belgium) was used to take microCT scans of the specimens. The parameters used were 9.92 µm isotropic pixel, 60 KV/165, 134 µA, filter Al 0.5 mm, exposure time 596 ms, rotation step 0.4 degrees, frame average 4, and random movement 10. The analyses were performed using DataViewer (Bruker).

Histological preparation

Precision cutting/grinding equipment (Exakt, Apparatebau, Norderstedt, Germany) was used to prepare two histological slides from each biopsy specimen after

dehydration, inclusion in resin (LR White Hard Grid, London Resin, Berkshire, UK) and polymerisation. The small screw placed in the naso-incisal suture was used as a reference. The two slides were stained with either toluidine blue or Stevenel's blue and alizarin red.

Histometric evaluations

Photomicrographs were taken under the microscope (Leica DMLB, Wetzlar, Germany) using a digital camera (Digital Sight DS-2Mv, Nikon, Tokyo, Japan).

The following regions were analysed within the elevated space (Fig 2): medial bone wall (M), lateral bone wall (L), sub-sinus region (S), central area (C) and osteotomy region (A).

A grid of 80 squares was superimposed on the images of the histological slides using the software Image J 1.50i (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and a point-counting procedure at 100× magnification was adopted for morphometric measurements⁴⁵. New bone (not covered by graft shadows), interpenetrating bone network (IBN; see-through bone graft in the Cerabone group) and residual xenogeneic bone were assessed. Total bone was calculated as the sum of new bone and IBN. Percentages were calculated with respect to the total area of the region evaluated and a mean value was obtained for the five regions. Before taking the measurements, calibration with another expert examiner (SPX) was performed until an inter-class correlation coefficient $k > 0.9$ was achieved for tissue recognition.

Data analysis

The primary variable was the mean total bone percentage in the full elevated space. The data from the various

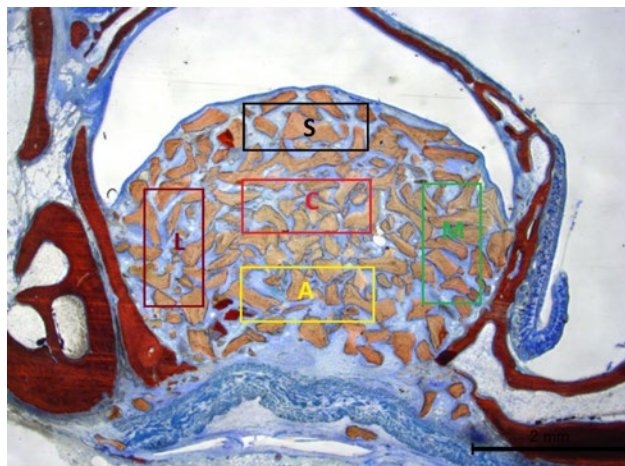


Fig 2 References scheme. Five regions of the sinus were identified: the osteotomy region (A), the central area of the graft (C), the sub-sinus region, subjacent to the sinus mucosa (S), and the regions close to the medial (M) and lateral bone walls (L).

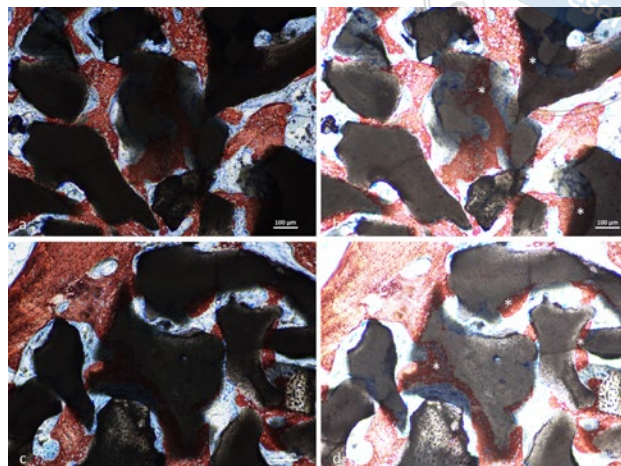


Fig 3 Photomicrographs of ground sections of Cerabone sites after 10 weeks of healing. Note the translucent dark fog-like shadow regions that, after increasing the light intensity, revealed new bone (IBN). **(a and c)** Normal light intensity; **(b and d)** high light intensity. The white asterisks indicate examples of IBN regions.

regions were used to establish a more detailed description of bone formation.

Prism 9.1.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for statistical analyses. The normal distribution of the variables was assessed with a Shapiro-Wilk test for both paired and unpaired variables. Either a paired *t* test or a Wilcoxon test was used to evaluate the differences between the Bio-Oss and Cerabone groups. Differences between the two healing periods were evaluated using either an unpaired *t* test or a Mann-Whitney test.

A Spearman two-tailed correlation coefficient was applied to measure the strength of the correlation between the outcomes of the histological and microCT analyses. GraphPad Prism 9.1.1 was used. The correlation coefficient and *P* values were reported. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

The tables listed mean values, standard deviations, *P* values, medians and 25% and 75% percentiles, whereas in the text only mean values were reported.

Results

Descriptive histological evaluation

In the histological analysis, the surface of the biomaterial was well defined for the Bio-Oss granules whereas for Cerabone, translucent dark fog-like shadows gave

the granules an undefined periphery. In some instances, especially at the 10-week period, these shadows hid the presence of new bone that was unveiled when light intensity was increased when the photomicrographs were taken under the microscope (IBN; Figs 3a to d). After 2 weeks of healing, very small amounts of new bone were observed in both groups, mainly confined to close to the sinus bone walls and osteotomy edges, whereas the other regions were practically devoid of new bone (Figs 4a and b). The graft material occupied almost half of the elevated space.

Ridges of new bone sprouting from the sinus bone walls towards the centre of the elevated space incorporated the nearest granules in both the Cerabone (Fig 5a) and Bio-Oss (Fig 5b) groups. The granules furthest from the bone walls were instead surrounded by soft tissue, presenting a dense layer of fibroblast-like cells disposed along the graft surface. Some osteoclast-like cells were also seen on the surface of both biomaterials (Figs 5a and b). The osteotomy was still covered by the collagen membrane (Figs 4a and b) involved in degradation processes. New bone was forming from the edges of the osteotomies, aiming to close the defect (Figs 5c and d). A few granules were found in some specimens beyond the osteotomy in both groups.

After 10 weeks of healing, new bone was found in all regions, with higher percentages recorded in regions close to the bone walls and the osteotomy (Figs 6a and b). The granules presented a higher grade

Fig 4 Photomicrographs of ground sections after 2 weeks of healing. **(a)** Cerabone site; **(b)** Bio-Oss site. Stevenel's blue and alizarin red staining were used. The yellow arrows indicate new bone forming from the mesial bone walls of the sinus on both sides.

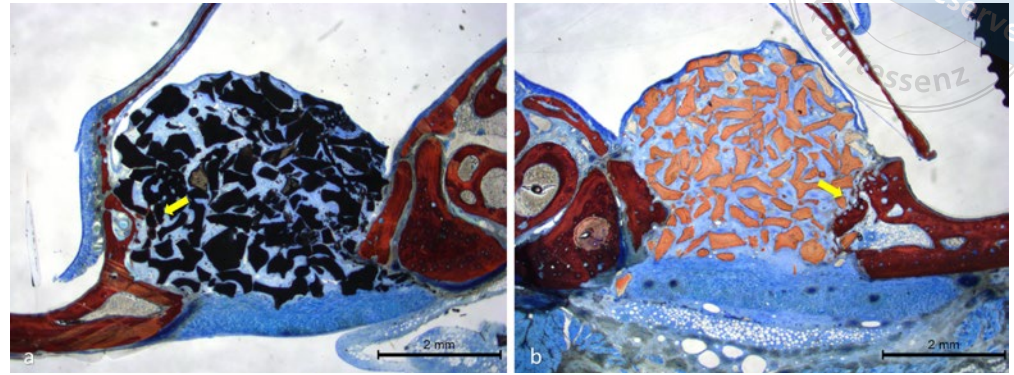


Fig 5 Photomicrographs of ground sections after 2 weeks of healing. New bone formed from the bone walls surrounded the closest **(a)** Cerabone and **(b)** Bio-Oss granules. New bone forming from the osteotomy edge at the **(c)** Cerabone and **(d)** Bio-Oss sites. **(a and b)** Stevenel's blue and alizarin red staining; **(c and d)** toluidine blue staining. The yellow arrows indicate new bone, the yellow asterisks mark old parent bone, the red asterisks show biomaterial and the red arrows indicate osteoclasts.

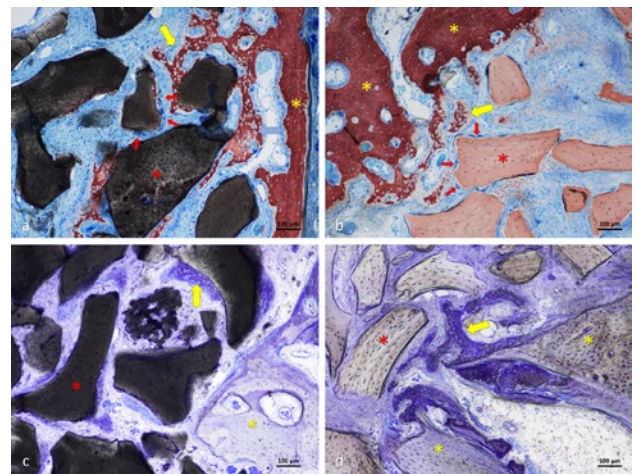
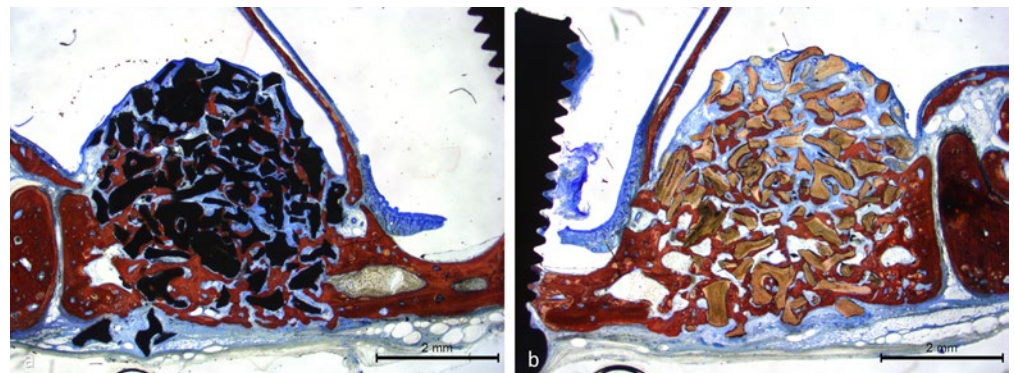


Fig 6 Photomicrographs of ground sections after 10 weeks of healing. New bone was found in all regions examined at both **(a)** Cerabone and **(b)** Bio-Oss sites. Stevenel's blue and alizarin red staining were used.



of incorporation into newly formed bone compared to the previous healing period (Figs 7a and d). The regions subjacent to the sinus mucosa presented the lowest amounts of new bone. Most of the osteotomies were closed by newly formed bone with signs of remodelling. The degradation of the collagen membrane was not completed yet (Figs 6a and b). Some granules were found beyond the osteotomy and several perforations of the sinus mucosa were observed for both biomaterials.

Histometric evaluation

After 2 weeks of healing (Table 1), IBN was almost absent such that both new bone and total bone fractions were 0.7% and 0.3% for the Bio-Oss and Cerabone groups, respectively ($P = 0.098$). The residual graft fraction was 43.4% for the Bio-Oss group and 48.8% for the Cerabone group ($P = 0.037$).

New bone was mostly located close to the sinus bone walls (Table 2). A slight tendency towards higher bone

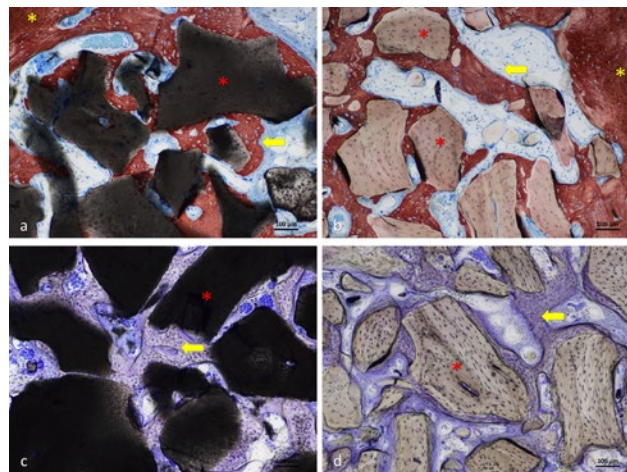


Fig 7 Photomicrographs of ground sections after 10 weeks of healing. New bone incorporated the granules of both biomaterials and formed bridges that interconnected the granules. **(a and c)** Cerabone and **(b and d)** Bio-Oss granules. **(a and b)** Stevenel's blue and alizarin red staining; **(c and d)** toluidine blue staining.

formation was seen in the Bio-Oss group compared to the Cerabone group in all regions. The submucosa region was virtually devoid of new bone in both groups. None of the differences between groups were statistically significant considering the various regions.

After 10 weeks of healing (Table 1), small fractions of IBN were found in the Cerabone group (1.3%). Total bone was found in proportions of 20.0% in the Bio-Oss group, and 17.2% in the Cerabone group ($P = 0.162$).

The residual graft decreased with respect to the previous healing period to 36.4% and 35.3% ($P = 0.846$) in the Bio-Oss and Cerabone groups, respectively (Fig 8). In both groups, the differences between periods in total bone and residual graft percentages were statistically significant ($P < 0.05$).

In both groups, the regions presenting the greatest amount of new bone were those close to the window, followed by those close to the sinus bone walls

Table 1 Percentage of new bone and graft remnants within the full elevated area.

Time point	Grafting material	New bone, %			IBN, %		
		Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value
2 weeks	Bio-Oss	0.7 ± 0.8	0.4 (0.2; 0.6)	0.098	0.0 ± 0.0	0.0 (0.0; 0.0)	NA
	Cerabone	0.3 ± 0.2	0.3 (0.1; 0.4)		0.0 ± 0.1	0.0 (0.0; 0.0)	
10 weeks	Bio-Oss	20.0 ± 4.3	21.4 (18.1; 22.1)	0.041	0.0 ± 0.0	0.0 (0.0; 0.0)	NA
	Cerabone	15.8 ± 4.0	14.5 (13.8; 19.6)		1.3 ± 0.6	1.5 (1.2; 1.5)	

$P < 0.05$.

Table 2 Total bone percentages after 2 weeks of healing. The various regions of the augmented area were evaluated.

Grafting material	Full augmented area			Next-to-window			Central		
	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value
Bio-Oss	0.7 ± 0.8	0.4 (0.2; 0.6)	0.159	0.3 ± 0.5	0.0 (0.0; 0.4)	0.250	0.3 ± 0.8	0.0 (0.0; 0.0)	0.750
Cerabone	0.3 ± 0.3	0.3 (0.1; 0.5)		0.0 ± 0.0	0.0 (0.0; 0.0)		0.1 ± 0.1	0.0 (0.0; 0.0)	

Table 3 Percentage of new bone after 10 weeks of healing. The various regions of the augmented area were assessed.

Grafting material	Full elevated area			Next-to-window			Central		
	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value
Bio-Oss	20.0 ± 4.3	21.4 (18.1; 22.1)	0.162	31.5 ± 8.1	32.4 (28.0; 33.7)	0.018	13.8 ± 8.3	13.4 (7.8; 21.6)	0.585
Cerabone	17.2 ± 4.3	15.8 (14.1; 21.1)		21.9 ± 7.8	22.9 (21.0; 24.6)		12.2 ± 5.1	12.8 (8.6; 15.3)	

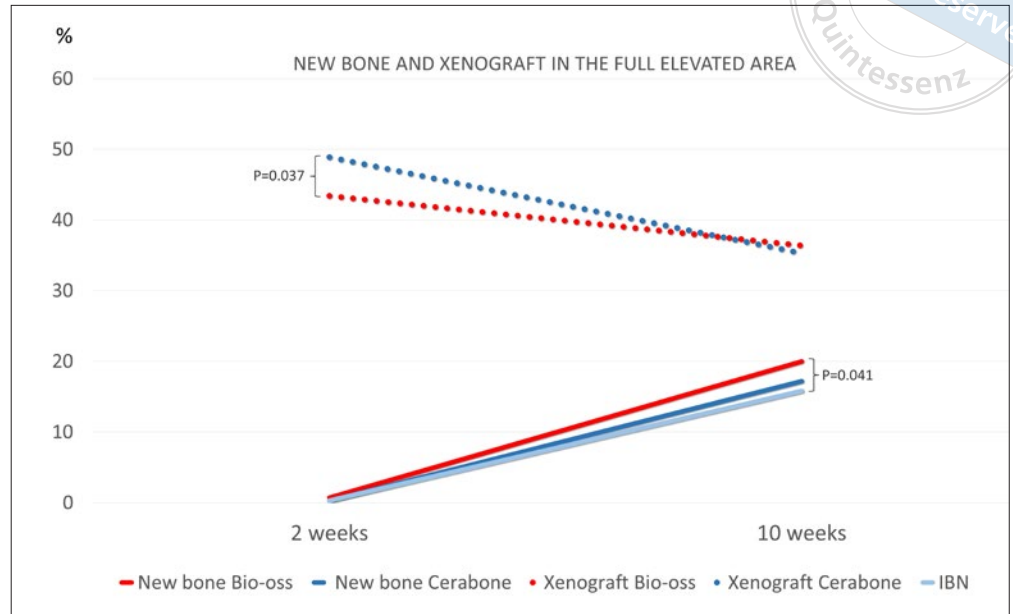


Fig 8 New bone formation and xenogeneic bone graft resorption between 2 and 10 weeks of healing.

(Table 3). In these regions, the total bone percentage was higher in the Bio-Oss group; however, only the difference at the next-to-window wall region was statistically significant ($P = 0.018$). The lowest percentage of new bone was found in the submucosa regions, followed by the central region.

microCT evaluation

The evaluation was performed at two different thresholds of grey levels to identify bone tissue from xenogeneic bone graft, namely 60 to 80 and 70 to 100. After 2 weeks of healing (Figs 9a to c), the tissue vol-

Total bone, %				Residual graft, %		
Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value	
0.7 ± 0.8	0.4 (0.2; 0.6)	0.159	43.4 ± 6.2	45.6 (40.0; 47.6)	0.037	
0.3 ± 0.3	0.3 (0.1; 0.5)		48.8 ± 4.3	50.0 (49.2; 51.5)		
20.0 ± 4.3	21.4 (18.1; 22.1)	0.162	36.4 ± 4.3	36.4 (35.0; 38.2)	0.846	
17.2 ± 4.3	15.8 (14.1; 21.1)		35.3 ± 10.5	39.7 (33.5; 41.5)		

Submucosa			Lateral wall			Medial wall		
Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value
0.0 ± 0.0	0.0 (0.0; 0.0)	1.000	1.0 ± 1.2	0.8 (0.0; 1.3)	0.231	1.7 ± 2.2	0.5 (0.1; 2.6)	0.214
0.0 ± 0.0	0.0 (0.0; 0.0)		0.4 ± 0.5	0.2 (0.0; 0.7)		1.0 ± 1.3	0.3 (0.0; 1.7)	

Submucosa			Lateral wall			Medial wall		
Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value	Mean ± SD	Median (25%; 75%)	P value
6.9 ± 6.1	5.4 (3.0; 9.6)	0.112	22.1 ± 10.5	21.2 (15.7; 28.6)	0.529	25.7 ± 6.8	27.0 (21.6; 29.1)	0.242
9.7 ± 5.6	11.5 (4.7; 13.6)		19.4 ± 8.5	18.6 (14.8; 25.4)		22.6 ± 8.3	24.3 (18.8; 29.7)	

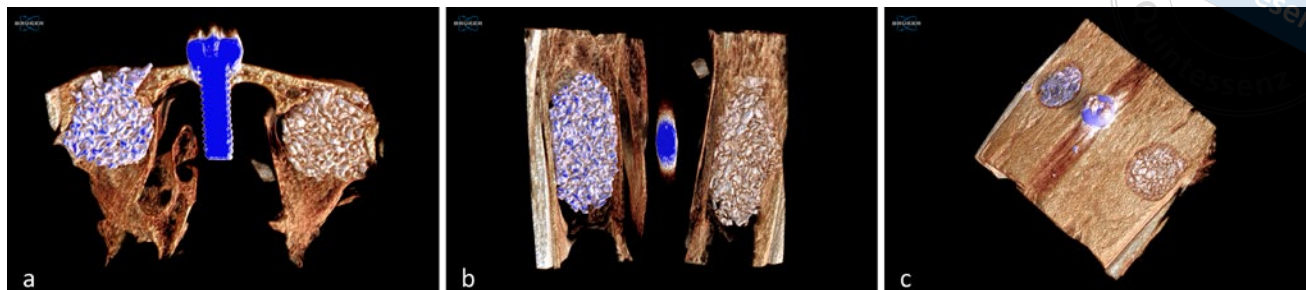


Fig 9 MicroCT 3D images representing healing in the grafted sinus after 2 weeks. **(a)** Coronal; **(b)** from the sinus; **(c)** from the nasal bone. Cerabone grafts are on the left and Bio-Oss grafts are on the right side of the image.

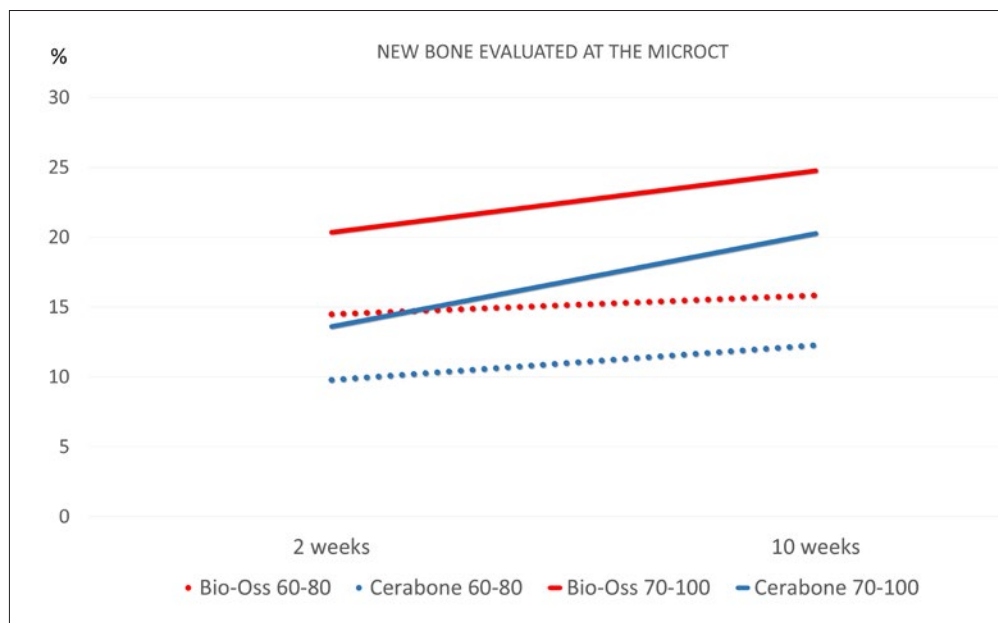


Fig 10 Percentage of new bone evaluated in the microCT analysis using different grey levels: 60 to 80 and 70 to 100.

umes of the elevated spaces were $78.52 \pm 8.89 \text{ mm}^3$ and $80.44 \pm 13.12 \text{ mm}^3$ for the Bio-Oss and Cerabone groups, respectively ($P = 0.208$). The grey level of 60 to 80 yielded $14.48\% \pm 2.29\%$ and $9.79\% \pm 1.27\%$ ($P < 0.0001$) of new bone in the Bio-Oss and Cerabone groups, respectively (Fig 10). Applying a grey level of 70 to 100, the respective proportions of new bone were $20.35\% \pm 3.37\%$ and $13.60\% \pm 2.09\%$ ($P < 0.0001$).

After 10 weeks of healing (Figs 11a to c), the tissue volumes of the elevated spaces were $84.49 \pm 9.78 \text{ mm}^3$ and $92.96 \pm 12.0 \text{ mm}^3$ for the Bio-Oss and Cerabone groups, respectively ($P = 0.057$). The grey level of 60 to 80 disclosed $15.83\% \pm 1.82\%$ and $12.28\% \pm 0.96\%$ ($P < 0.0001$) of new bone in the Bio-Oss and Cerabone groups, respectively. Applying a grey level of 70 to 100, $24.76\% \pm 2.50\%$ was recorded in the Bio-Oss group, and $20.26\% \pm 1.57\%$ in the Cerabone group ($P < 0.0001$).

Correlation between 10-week histological and microCT analyses

Applying a grey level of 60 to 80 for bone tissue evaluation, a weak positive correlation for the Bio-Oss group (0.091 ; $P = 0.811$) and a weak negative correlation for the Cerabone group (-0.333 ; $P = 0.349$) were found. Using a grey level of 70 to 100, a strong positive correlation for the Bio-Oss group (0.709 ; $P = 0.027$) and a weak positive correlation for the Cerabone group (0.212 ; $P = 0.560$) were found.

Discussion

The present study aimed to compare the sequential healing of maxillary sinuses grafted with two different xenogenic bone substitutes sintered at either a low or high temperature. After 10 weeks of healing, the histological

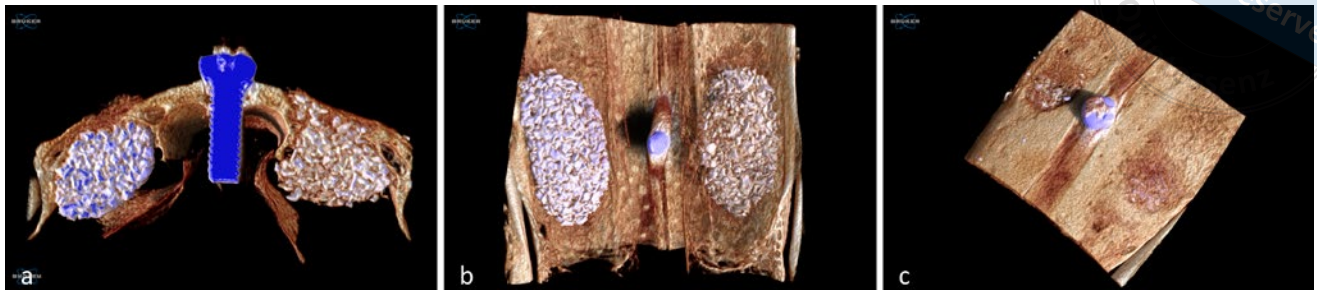


Fig 11 MicroCT 3D images representing healing in the grafted sinus after 10 weeks. **(a)** Coronal; **(b)** from the sinus; **(c)** from the nasal bone. Cerabone grafts are on the left and Bio-Oss grafts are on the right side of the image.

evaluation showed that a tendency towards higher bone formation was found in the Bio-Oss group compared to the Cerabone group; however, the difference was not statistically significant. In both groups, the highest percentages of new bone were observed in the regions close to the bone walls and the osteotomy.

In the Cerabone group, several graft particles presented dark regions with fog-like shadows that hid the hard and soft tissues. These tissues were shown more clearly under the microscope when overexposing the image to the light whereas, when adjusting the focus, no improvement was made in the identification. This method made it possible to identify new bone hidden by the shadows and was illustrated in other articles in which biphasic beta tricalcium phosphate/hydroxyapatite (β -TCP/HA) were used for sinus floor augmentation in sheep⁴⁶ and rabbits⁴⁷ and recently in human biopsy specimens to unveil bone covered by shadows around Cerabone⁴⁸. The total amount of bone reported represented the sum of new bone outside the dark shadows and that covered by those shadows (IBN). The structure of the IBN recalled that of an “interpenetrating polymer network”⁴⁹ and consequently, a similar name was adopted.

After 2 weeks of healing, the percentage of new bone in the full elevated area was $< 1\%$ in both groups. The inclusion of an early period of healing in the analysis of the present study enabled the differences in the regions close to the source of new bone to be evaluated and, at the same time, provided the opportunity to assess dimensional variations over time. After 2 weeks of healing, the postsurgical oedema that occurs after sinus floor augmentation⁵⁰⁻⁵³ appeared to be resolved. The resorptive processes were still in an early phase, resulting in little effect on dimensional changes. During this healing period in both groups, bone was formed from the lateral sinus walls while, in the submucosa area, no new bone was found. This is in agreement with several

other reports that showed the absence of participation of the sinus mucosa in bone formation during this early period of healing^{8,9,54-55}.

After 10 weeks, new bone proportions increased in both groups in all regions included in the analyses. In this healing period, the proportion of new bone was 20.0% in the Bio-Oss group and 17.2% in the Cerabone group. A comparison of the results of healing between Bio-Oss and Cerabone after sinus floor augmentation was also performed in a clinical study³¹. Biopsy specimens were harvested after 6 months from the augmented sinus, and the proportion of new bone was 41.4% in the Bio-Oss group and 39.2% in the Cerabone group; however, the difference was not statistically significant³¹. These proportions of new bone were approximately double for both groups compared to the present study. The difference in percentage might be related to the different model used, but also to the fact that the biopsy specimens in the animal study comprised all regions of the sinus, including those with very little bone such as that subjacent to the submucosa. In the previous study, only the region close to the base of the sinus was included in the analysis³¹, i.e., closer to an important source of new bone^{50,51}.

In another clinical study, the analysis performed on biopsy specimens harvested after 8 months from sinus augmentation revealed higher proportions of new bone in the Cerabone group (29.1%) compared to the Bio-Oss group (24.6%)⁵⁶. Again, the difference was not statistically significant.

In the present study, in both groups, the highest amounts of new bone were located close to the bone walls and the osteotomy. Both biomaterials allowed new bone formation and, after 2 weeks, the first signs of incorporation of the neighbouring granules were already noted close to the bone walls. After 10 weeks, incorporation of the granules was observed in all regions. This event has been described in other experimental

studies^{24,27,28}. In an experiment on sinus augmentation in rabbits, the sequential events of bone-to-graft contact at DBBM granules were analysed after 7, 14, 20 and 40 days of healing²⁴. After 7 days, small amounts of bone were found close to the bone walls, whereas the DBBM granules were surrounded by soft tissue containing fibres and fibroblast-like cells arranged in layers in direct contact with the biomaterial surface, and after 14 days, several DBBM granules were covered by newly formed bone; however, the majority were surrounded by dense tissues, similar to those observed after 7 days of healing, and the regions between granules were occupied by loose tissue, poor in cells but rich in vessels²⁴. In the following healing periods, further granules were enclosed by newly formed bone, and the surfaces not covered by bone presented dense tissues²⁴. The regions including those between granules, first occupied by loose tissues, underwent a transformation into primitive bone marrow²⁴.

In the present study, after 10 weeks of healing, new bone in the whole area of the Bio-Oss group reached a proportion of 20.0%. This result is similar to that reported in another study in which Bio-Oss granules were treated with Argon plasma or left untreated before being used to fill the subantral space in rabbits²⁶. The percentages of new bone after 10 weeks were 23.5% in the plasma group and 21.3% in the untreated group. The histological analyses were also performed in the bone wall and central regions of the sinuses²⁶. The proportion of new bone in the group not treated with argon plasma was 26.3% in the bone wall region, and 13.2% in the central regions²⁶. These data are consistent with those of the present study, with the proportion of new bone being approximately 22.0% to 26.0% in the bone wall region and 13.8% in the central region.

In both groups in the present study, the submucosa region exhibited lower amounts of new bone compared to the other regions examined, namely 6.9% and 9.7% in the Bio-Oss and Cerabone groups, respectively. Other similar experiments on sinus augmentation in rabbits reported data on bone formation in this region⁵⁷⁻⁶¹. The presence of new bone subjacent to the sinus mucosa cannot exclude its contribution to bone formation; however, if this contribution does exist, it is limited. It is also necessary to consider that several perforations of the sinus mucosa were observed with relation to the biomaterial particles in both groups. It has been shown in a rabbit model that the presence of sinus mucosa perforations compromised new bone formation in the adjacent regions within the sinus⁶².

The difference in percentage between 2 and 10 weeks of healing was 7.0% for Bio-Oss and 13.5% for

Cerabone. This means that part of the biomaterial was resorbed or lost through the osteotomy or the sinus mucosa. Indeed, several osteoclastic-like zones were observed around both biomaterials at the 2-week evaluation period whereas after 10 weeks, osteoclastic-like cells were rarely observed. This observation agrees with other reports that showed a progressively decreasing percentage of osteoclasts within the augmented space over time^{54,55}.

The two bovine cancellous bone grafts used in the present experiment as fillers for sinus augmentation were processed at different temperatures, namely 300°C for Bio-Oss and 1200°C for Cerabone. The process carried out at a high temperature produces macroporous particles with increased crystallinity which might result in slower resorption of the graft, and decreases the microporosity of the surface which might also reduce the osteoconductivity⁶³⁻⁶⁵. In the present study, however, despite the use of similar volumes of biomaterial in all sinuses, slightly higher volumes were found after 10 weeks compared to 2 weeks of healing. This in turn means that the volumes were maintained over time or even increased, perhaps for bone apposition.

The microCT showed higher percentages of new bone in the Bio-Oss group compared to the Cerabone group ($P > 0.0001$). The data yielded from the microCT analysis were not completely in agreement with those from the histological analysis, especially for the 2-week period. These differences might be ascribed to the fact that histology is a 2-dimensional analysis that represents only a central, limited portion of the sinus that includes the osteotomy. The microCT analysis instead assesses the whole volume that also includes regions located distally and mesially to the osteotomy, in contact with the nasal bone, that represent a further source for bone formation; however, another aspect that should be considered is that the microCT analysis might make it difficult to discriminate between bone and xenogeneic bone graft, yielding contradictory outcomes compared to the histological assessments, especially in the earliest periods of healing^{25,66}. Indeed, three out of four correlations evaluated between the bone percentage after 10 weeks in the Bio-Oss and Cerabone groups were weak, whereas only that for the Bio-Oss group applying a grey level of 70 to 100 was strong positive.

With regard to the limitations of the present study, the dark fog-like shadows present in some regions of Cerabone granules should be mentioned. This event, perhaps due to the high porosity of the biomaterial, the stain characteristics or the slow degradation of the biomaterial⁶⁷, might obstruct identification of new bone and decrease the percentage of new bone detected with

Cerabone. The model used represents another limitation of the study considering the dimensions of the sinus and the lower thickness of the sinus mucosa compared to humans⁵⁴. Moreover, healing in rabbits has been shown to be faster compared to humans⁶⁸; thus, any inferences about humans must be taken with caution.

Conclusion

The present study illustrated that both biomaterials provided conditions that allowed bone growth within the elevated space and confirmed that both biomaterials are suitable to be used as graft materials for sinus floor augmentation. The overexposure to the microscope light in the histological preparation might help to identify the tissues veiled by the dark shadows surrounding Cerabone particles.

Acknowledgements

The authors acknowledge the contribution of Sebastião Bianco (Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) for the histological processing. The Cerabone xenogeneic bone graft was provided free of charge by Straumann Italy, Milan, Italy.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest related to this study.

Author contribution

Drs Vitor FERREIRA BALAN, Daniele BOTTICELLI, David PEÑARROCHA-OLTRA and Samuel Porfirio XAVIER contributed to the conceptualization of the study; Vitor FERREIRA BALAN and Eduardo PIRES GODOY contributed to surgical procedures; Dr Vitor FERREIRA BALAN contributed to the histological and microCT analyses; Drs Vitor FERREIRA BALAN, Daniele BOTTICELLI and Katsuhiko MASUDA contributed to the data analysis; Drs Daniele BOTTICELLI and Samuel Porfirio XAVIER contributed to the supervision of the project; Drs Vitor FERREIRA BALAN and Daniele BOTTICELLI contributed to the manuscript draft; Drs David PEÑARROCHA-OLTRA, Katsuhiko MASUDA, Daniele BOTTICELLI and Samuel Porfirio XAVIER contributed to finalising the article. All authors have read and approved the published version of the manuscript.

(Received Jan 30, 2022; accepted Mar 09, 2022)

References

1. Pjetursson BE, Tan WC, Zwahlen M, Lang NP. A systematic review of the success of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation. *J Clin Periodontol* 2008;35(8, suppl):216–240.
2. Asai S, Shimizu Y, Ooya K. Maxillary sinus augmentation model in rabbits: Effect of occluded nasal ostium on new bone formation. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:405–409.
3. Xu H, Shimizu Y, Asai S, Ooya K. Grafting of deproteinized bone particles inhibits bone resorption after maxillary sinus floor elevation. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:126–133.
4. 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;27:1106–1122.
5. Ellegaard B, Kølsen-Petersen J, Baelum V. Implant therapy involving maxillary sinus lift in periodontally compromised patients. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:305–315.
6. Lundgren S, Andersson S, Gualini F, Sennerby L. Bone reformation with sinus membrane elevation: A new surgical technique for maxillary sinus floor augmentation. *Clin Implant Dent Relat Res* 2004;6:165–173.
7. Ellegaard B, Baelum V, Kølsen-Petersen J. Non-grafted sinus implants in periodontally compromised patients: A time-to-event analysis. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:156–164.
8. Scala A, Botticelli D, Faeda RS, Rangel IG Jr, de Oliveira JA, Lang NP. Lack of influence of the Schneiderian membrane in forming new bone apical to implants simultaneously installed with sinus floor elevation: An experimental study in monkeys. *Clin Oral Implants Res* 2012;23:175–181.
9. Scala A, Botticelli D, Rangel IG Jr, de Oliveira JA, Okamoto R, Lang NP. Early healing after elevation of the maxillary sinus floor applying a lateral access: A histological study in monkeys. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:1320–1326.
10. Cricchio G, Palma VC, Faria PE, et al. Histological findings following the use of a space-making device for bone reformation and implant integration in the maxillary sinus of primates. *Clin Implant Dent Relat Res* 2009;11(suppl 1):e14–e22.
11. Cricchio G, Palma VC, Faria PE, et al. Histological outcomes on the development of new space-making devices for maxillary sinus floor augmentation. *Clin Implant Dent Relat Res* 2011;13:224–230.
12. Schweikert M, Botticelli D, de Oliveira JA, Scala A, Salata LA, Lang NP. Use of a titanium device in lateral sinus floor elevation: An experimental study in monkeys. *Clin Oral Implants Res* 2012;23:100–105.
13. Johansson LÅ, Isaksson S, Adolfsson E, Lindh C, Sennerby L. Bone regeneration using a hollow hydroxyapatite space-maintaining device for maxillary sinus floor augmentation--A clinical pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2012;14:575–584.
14. Klijjn RJ, Meijer GJ, Bronkhorst EM, Jansen JA. Sinus floor augmentation surgery using autologous bone grafts from various donor sites: A meta-analysis of the total bone volume. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16:295–303.
15. De Santis E, Lang NP, Ferreira S, Garcia IR Jr, Caneva M, Botticelli D. Healing at implants installed concurrently to maxillary sinus floor elevation with Bio-Oss® or autologous bone grafts. A histomorphometric study in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2017;28:503–511.
16. Scala A, Lang NP, de Carvalho Cardoso L, Pantani F, Schweikert M, Botticelli D. Sequential healing of the elevated sinus floor after applying autologous bone grafting: An experimental study in minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2015;26:419–425.
17. Clavero J, Lundgren S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: Comparison of donor site morbidity and complications. *Clin Implant Dent Relat Res* 2003;5:154–160.

18. Jensen T, Schou S, Svendsen PA, et al. Volumetric changes of the graft after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios: A radiographic study in minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2012;23:902–910.
19. Sbordone L, Levin L, Guidetti F, Sbordone C, Glikman A, Schwartz-Arad D. Apical and marginal bone alterations around implants in maxillary sinus augmentation grafted with autogenous bone or bovine bone material and simultaneous or delayed dental implant positioning. *Clin Oral Implants Res* 2011;22:485–491.
20. Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012;41:114–120.
21. Manfro R, Fonseca FS, Bortoluzzi MC, Sendyk WR. Comparative, histological and histomorphometric analysis of three anorganic bovine xenogenous bone substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic. *J Maxillofac Oral Surg* 2014;13:464–470.
22. Moon JW, Sohn DS, Heo JU, Kim JS. Comparison of two kinds of bovine bone in maxillary sinus augmentation: A histomorphometric study. *Implant Dent* 2015;24:19–24.
23. 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;18:926–936.
24. Caneva M, Lang NP, Rangel IG Jr, et al. Sinus mucosa elevation using Bio-Oss® or Gingistat® collagen sponge: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2017;28:e21–e30.
25. 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;24:57–64.
26. Hirota A, Yamada Y, Canullo L, Xavier SP, Baba S. Bioactivation of bovine bone matrix using argon plasma: An experimental study for sinus augmentation in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2020;35:731–738.
27. Busenlechner D, Huber CD, Vasak C, Dobsak A, Gruber R, Watzek G. Sinus augmentation analysis revised: The gradient of graft consolidation. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:1078–1083.
28. Godoy EP, Alccayhuaman KAA, Botticelli D, et al. Osteoconductivity of bovine xenograft granules of different sizes in sinus lift: A histomorphometric study in rabbits. *Dent J (Basel)* 2021;9:61.
29. Galindo-Moreno P, Hernández-Cortés P, Aneiros-Fernández J, et al. Morphological evidences of Bio-Oss® colonization by CD44-positive cells. *Clin Oral Implants Res* 2014;25:366–371.
30. Riachi F, Naaman N, Tabarani C, et al. Influence of material properties on rate of resorption of two bone graft materials after sinus lift using radiographic assessment. *Int J Dent* 2012;2012:737262.
31. Mahesh L, Mascarenhas G, Bhasin MT, Guirado C, Juneja S. Histological evaluation of two different anorganic bovine bone matrixes in lateral wall sinus elevation procedure: A retrospective study. *Natl J Maxillofac Surg* 2020;11:258–262.
32. Zahedpasha A, Ghassemi A, Bijani A, Haghaniifar S, Majidi MS, Ghorbani ZM. Comparison of bone formation after sinus membrane lifting without graft or using bone substitute “histologic and radiographic evaluation”. *J Oral Maxillofac Surg* 2021;79:1246–1254.
33. Tawil G, Barbeck M, Unger R, Tawil P, Witte F. Sinus floor elevation using the lateral approach and window repositioning and a xenogeneic bone substitute as a grafting material: A histologic, histomorphometric, and radiographic analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2018;33:1089–1096.
34. Imai H, Lang NP, Ferri M, Hirota A, Apaza Alccayhuaman KA, Botticelli D. Tomographic assessment on the influence of the use of a collagen membrane on dimensional variations to protect the antrostomy after maxillary sinus floor augmentation: A randomized clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2020;35:350–356.
35. Perić Kačarević Z, Kavehei F, Houshmand A, et al. Purification processes of xenogeneic bone substitutes and their impact on tissue reactions and regeneration. *Int J Artif Organs* 2018;41:789–800.
36. Laschke MW, Witt K, Pohlemann T, Menger MD. Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: In vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;82:494–505.
37. Huber FX, Berger I, McArthur N, et al. Evaluation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste and a solid hydroxyapatite ceramic for the treatment of critical size bone defects (CSD) in rabbits. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19:33–38.
38. Catros S, Sandgren R, Pippenger BE, Fricain JC, Herber V, El Char E. A novel xenograft bone substitute supports stable bone formation in circumferential defects around dental implants in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2020;35:1122–1131.
39. Shakir M, Jolly R, Khan AA, et al. Resol based chitosan/nano-hydroxyapatite nanoensemble for effective bone tissue engineering. *Carbohydr Polym* 2018;179:317–327.
40. Kumlien J, Schiratzki H. Blood flow in the rabbit sinus mucosa during experimentally induced chronic sinusitis. Measurement with a diffusible and with a non-diffusible tracer. *Acta Otolaryngol* 1985;99:630–636.
41. Kennedy DW, Shaalan H. Reevaluation of maxillary sinus surgery: Experimental study in rabbits. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1989;98:901–906.
42. Trajkovski B, Jaunich M, Müller WD, Beuer F, Zafiroopoulos GG, Houshmand A. Hydrophilicity, viscoelastic, and physicochemical properties variations in dental bone grafting substitutes. *Materials (Basel)* 2018;11:215.
43. Costa MM, Botticelli D, Moses O, et al. Maxillary sinus augmentation using ceramic alloplastic granules or paste: An experimental study in rabbits. *Dent J (Basel)* 2021;9:65.
44. Lee JH, Yi GS, Lee JW, Kim DJ. Physicochemical characterization of porcine bone-derived grafting material and comparison with bovine xenografts for dental applications. *J Periodontal Implant Sci* 2017;47:388–401.
45. Schroeder HE, Münzel-Pedrazzoli S. Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue. Morphometric model, tissue sampling and test of stereologic procedures. *J Microsc* 1973;99:301–329.
46. Perini A, Ferrante G, Sivolella S, Velez JU, Bengazi F, Botticelli D. Bone plate repositioned over the antrostomy after sinus floor elevation: An experimental study in sheep. *Int J Implant Dent* 2020;6:11.
47. Tanaka K, Botticelli D, Canullo L, Baba S, Xavier SP. New bone ingrowth into β -TCP/HA graft activated with argon plasma: A histomorphometric study on sinus lifting in rabbits. *Int J Implant Dent* 2020;6:36.
48. Kotsu M, Apaza Alccayhuaman KA, Ferri M, et al. Osseointegration at implants installed in composite bone. A histological randomized clinical trial on sinus floor elevation. *J Funct Biomater* 2022;13:22.
49. International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of Chemical Terminology (the “Gold Book”), ed 2. <https://goldbook.iupac.org/> Accessed April 30 2022.
50. Kawakami S, Lang NP, Iida T, Ferri M, Apaza Alccayhuaman KA, Botticelli D. Influence of the position of the antrostomy in sinus floor elevation assessed with cone-beam computed tomography: A randomized clinical trial. *J Investig Clin Dent* 2018;9:e12362.
51. Kawakami S, Lang NP, Ferri M, Apaza Alccayhuaman KA, Botticelli D. Influence of the height of the antrostomy in sinus floor elevation assessed by cone beam computed tomography – A randomized clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2019;34:223–232.
52. Kato S, Omori Y, Kanayama M, et al. Sinus mucosa thickness changes and ostium involvement after maxillary sinus floor elevation in sinus with septa. A cone beam computed tomography study. *Dent J (Basel)* 2021;9:82.
53. Sakuma S, Ferri M, Imai H, et al. Involvement of the maxillary sinus ostium (MSO) in the edematous processes after sinus floor augmentation: a cone-beam computed tomographic study. *Int J Implant Dent* 2020;6:35.

54. 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;28:1567–1576.
55. Omori Y, Ricardo Silva E, Botticelli D, Apaza Alccayhuaman KA, Lang NP, Xavier SP. Reposition of the bone plate over the antrotomy in maxillary sinus augmentation: A histomorphometric study in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2018;29:821–834.
56. Panagiotou D, Özkan Karaca E, Dirikan İpçi Ş, Çakar G, Olgaç V, Yılmaz S. Comparison of two different xenografts in bilateral sinus augmentation: Radiographic and histologic findings. *Quintessence Int* 2015;46:611–619.
57. Amari Y, Botticelli D, Apaza Alccayhuaman KA, Hirota A, Silva ER, Xavier SP. The influence on healing of bony window elevated inward in the sinus cavity as cortical bone graft: A histomorphometric study in rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2020;35:879–887.
58. Masuda K, Silva ER, Botticelli D, Apaza Alccayhuaman KA, Xavier SP. Antrotomy 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;34:819–827.
59. Scala A, Viña-Almunia J, Carda C, et al. Sequential healing of the elevated sinus floor with different size of antrotomy: A histomorphometric study in rabbits. *Oral Maxillofac Surg* 2020;24:403–410.
60. Scala A, Lang NP, Urbizo Velez J, 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;27:1454–1461.
61. Favero V, Lang NP, Canullo L, Urbizo Velez J, Bengazi F, Botticelli D. Sinus floor elevation outcomes following perforation of the Schneiderian membrane. An experimental study in sheep. *Clin Oral Implants Res* 2016;27:233–240.
62. Paik JW, Cha JK, Song YW, Thoma DS, Jung RE, Jung UW. Effect of Schneiderian membrane integrity on bone formation in sinus augmentation: An experimental study in rabbits. *J Clin Periodontol* 2022;49:76–83.
63. Block MS. Does the use of high-temperature-processed xenografts for ridge augmentation result in ridge width stability over time? *J Oral Maxillofac Surg* 2020;78:1717–1725.
64. Block MS. The processing of xenografts will result in different clinical responses. *J Oral Maxillofac Surg* 2019;77:690–697.
65. Ramírez Fernández MP, Mazón P, Gehrke SA, Calvo-Guirado JL, De Aza PN. Comparison of two xenograft materials used in sinus lift procedures: Material characterization and in vivo behavior. *Materials (Basel)* 2017;10:623.
66. Iida T, Silva ER, Lang NP, Apaza Alccayhuaman KA, Botticelli D, Xavier SP. Histological and micro-computed tomography evaluations of newly formed bone after maxillary sinus augmentation using a xenograft with similar density and mineral content of bone: An experimental study in rabbits. *Clin Exp Dent Res* 2018;4:284–290.
67. Iezzi G, Piattelli A, Giuliani A, et al. Molecular, cellular and pharmaceutical aspects of bone grafting materials and membranes during maxillary sinus-lift procedures. Part 2: Detailed characteristics of the materials. *Curr Pharm Biotechnol* 2017;18:33–44.
68. Botticelli D, Lang NP. Dynamics of osseointegration in various human and animal models – A comparative analysis. *Clin Oral Implants Res* 2017;28:742–748.