



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

Trabalho de Conclusão de Curso

**INFLUÊNCIA DA MEMBRANA DE COLÁGENO EM SEIOS MAXILARES
ENXERTADOS COM OSSO MINERAL BOVINO. ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO
EM COELHOS.**

ALUNA: Anna Gabriella Biagini

ORIENTADOR: Prof. Dr. Samuel Porfirio Xavier

RIBEIRÃO PRETO

2018

Resumo

Introdução: A elevação do assoalho do seio maxilar foi introduzida por Tatum (1977, 1986) e desenvolvida por Boyne & James (1980). Este procedimento cirúrgico tem como objetivo aumentar o volume de osso nos segmentos posteriores da maxila, sendo amplamente difundido na terapia clínica com implantes.

Objetivos: Definir se a utilização de membranas de colágeno abaixo da mucosa Schneideriana pode afetar o reparo no espaço elevado em seios maxilares de coelhos. Avaliar o processo de reparo após a elevação da membrana sinusal quando uma membrana de colágeno é colocada entre a mmucosa Scheneideriana e o enxerto xenógeno usado.

Material e métodos: Em um modelo *split-mouth*, 18 coelhos foram utilizados para a elevação do seio maxilar em três tempos experimentais (2, 4 e 8 semanas), 6 animais por grupo. Todos os seios foram elevados bilateralmente e preenchidos com a utilização de osso mineral bovino. No primeiro grupo, no lado teste, foi utilizada uma membrana de colágeno abaixo da mucosa Schneideriana, enquanto que no lado controle não foi utilizada membrana. Cortes histológicos permitiram análise histomorfométrica de osso neoformado, tecido conjuntivo e biomaterial para análise estatística comparativa ANOVA entre períodos específicos.

Resultados: Na análise histomorfométrica, a área elevada após 2 e 8 semanas era de 11,8 e 8,8 mm² no lado teste e 10,0 e 5,3 mm² no lado controle, respectivamente. A avaliação da área foi obtida retirando o restante da área ocupada pela membrana da área elevada. Após 8 semanas a área obtida era 6,7 ± 0,9 mm², e o novo osso mineralizado na área elevada foi de 18,2 ± 5,5% no lado teste e 26,7 ± 7,7% no lado controle. Dentro do espaço avaliado no lado teste, a porcentagem foi de 27,3% ± 7,0% após 8 semanas. Após 2 e 8 semanas, na área elevada, a proporção de osso mineral bovino era de 30,9 ± 4,4% e 6,9 ± 2,8% no sítio teste e 35,2 ± 7,3% e 9,6 ± 4,9% no sítio controle, respectivamente.

Conclusão: a colocação da membrana de colágeno subjacente a membrana Schneideriana não revelou diferenças estatisticamente significantes. A membrana de colágeno não foi completamente reabsorvida após 8 semanas de cirurgia.

Introdução

A elevação do assoalho do seio maxilar, que tem como objetivo aumentar o volume de osso nos segmentos posteriores da maxila, foi introduzida por Tatum (1977, 1986) e desenvolvida por Boyne & James (1980). Este procedimento cirúrgico é amplamente difundido na terapia clínica com implantes osseointegráveis.

Vários materiais de enxerto têm sido propostos para aumentar o espaço obtido após a elevação da membrana sinusal. O osso autógeno tem sido considerado o "padrão ouro" para enxertia de seio maxilar (Klijn et al., 2010). No entanto, vários estudos têm documentado a reabsorção do osso autógeno (John & Wenz 2004; Jensen et al., 2012; Lambert et al., 2011; Cosso et al., 2013). Por conseguinte, as diferenças na reabsorção e diminuição da região elevada podem ser esperadas quando se utiliza ossos autógenos ou substitutos ósseos. Por outro lado, o osso autógeno não só pode ser reabsorvido, mas substituído por osso novo. Em contraste, substitutos ósseos como osso bovino mineral desproteínizado, permanecem praticamente inalterados por longos períodos (Xu et al., 2004). Embora frequentemente incorporados em tecido conjuntivo (Lambert et al., 2011), especialmente na região abaixo da membrana Schneideriana (Tadjoedin et al., 2003), estes enxertos não são reabsorvidos rapidamente.

No entanto, em situações de levantamento do seio sem presença de material de enxerto (Xu et al., 2004), com instalação de um dispositivo para posicionamento da membrana (Cricchio et al., 2009, 2011; Johansson et al., 2012; Schweikert et al., 2012), ou somente com implantes instalados simultaneamente no momento da elevação do seio maxilar (Ellegaard et al., 1997, Lundgren et al., 2004; Palma et al., 2006; Cricchio et al., 2013), foi observado que os seios maxilares tendem a retomar a sua forma original e repneumatizar (Xu et al 2004).

Um artigo recente mostrou que um reparo adequado pode ser obtido também na ausência de material de preenchimento ósseo, desde que os implantes sejam instalados imediatamente e a janela óssea seja recolocada na sua posição original (Lundgren et al., 2004;. Palma et al., 2006; Cricchio et al., 2013). Por outro lado, uma revisão mostrou que os melhores resultados na manutenção de implantes foram obtidos utilizando membrana reabsorvível para cobrir a osteotomia (Pjetursson et al., 2008). No entanto, um estudo clínico mostrou resultados similares entre os sítios não tratados e tratados com uma membrana reabsorvível, embora quantidade inferior de tecido conjuntivo tenha sido encontrada no grupo tratado em comparação ao não tratado (Barone et al., 2012). Curiosamente, num experimento recente em ovelhas (Favero et al., 2016), foi observado que em nenhum dos seios maxilares tratados houve um completo vedamento da janela de acesso, apesar do uso de uma membrana reabsorvível na janela.

Além disso, devemos considerar que os procedimentos de elevação de seio maxilar podem ser complicados por perfurações da mucosa do seio, que podem ocorrer por razões iatrogênicas, anatômicas ou fisiopatológicas. Tais perfurações podem levar ao deslocamento de material de enxerto dentro do seio e aumentar a incidência de complicações como sinusite (Nolan et al., 2014). Para vedar as perfurações da mucosa Schneideriana, tem sido sugerida utilização de membranas reabsorvíveis entre a mucosa do seio e do material de enxertia (Pikos, 1999; Proussaefs et al., 2003; Testori et al., 2008; Kim et al., 2014). Estes autores relataram que a colocação de uma membrana de colágeno pode levar a um maior preenchimento ósseo da cavidade sinusal, embora não existam estudos randomizados controlados que comprovem tais alegações.

Pode-se afirmar que a mucosa do seio maxilar apresenta potencial para produzir osso *in vitro* (Gruber et al., 2004;. Srouji et al., 2009, 2011, 2013). Além disso, outros autores têm sugerido que a mucosa pode participar no processo de formação óssea *in vivo* (Lundgren et al., 2004;. Palma et al., 2006; Cricchio et al., 2009, 2011). Contudo, existem controvérsias no que diz respeito à participação da mucosa sinusal na formação óssea nas fases iniciais do reparo (Scala et al., 2010, 2012). A aplicação de uma membrana de colágeno no caso de uma perfuração acidental da membrana sinusal irá separar a mucosa da cavidade do biomaterial inserido no espaço criado pela elevação

da mucosa. Isso pode impedir que a mucosa do seio expresse seu possível potencial de formação óssea.

Considerando as referências acima fornecidas, ainda existe uma necessidade de definir se a utilização de membranas de colagénio abaixo da mucosa Schneideriana pode afetar o reparo no espaço elevado.

Proposição

O objetivo do presente experimento foi determinar o efeito no reparo dentro de cavidades elevadas em seio maxilar e na janela de acesso quando a membrana de colágeno é colocada abaixo da mucosa Schneideriana, através de avaliação histomorfométrica de osso neoformado, tecido conjuntivo e biomaterial remanescente em um modelo animal.

Material e Métodos

O protocolo de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil. Dezoito coelhos *New Zealand*, adultos, pesando entre e 3,5-4,0 kg, com 5-6 meses de vida, foram incluídos nos experimentos.

O presente estudo foi realizado no modelo split mouth e as interferências entre os indivíduos foram eliminadas, assim um grupo pequeno de animais pode ser usado garantindo a representatividade da amostra. Levando em consideração o objetivo do estudo, os 18 animais foram divididos em 3 grupos de 6 coelhos (sacrifício após 2, 4 e 8 semanas pós-enxertia), de forma aleatória e randomizada, garantindo a observação de aspectos dos diferentes tempos de reparo.

A aleatorização para seleção dos sítios teste/ controle foi realizada eletronicamente (randomization.com) por um autor não envolvido na seleção dos coelhos e nos procedimentos cirúrgicos, de tal forma a apresentar nos sítios teste/ controle a seguinte configuração:

- **Lado Controle**: Enxerto de osso mineral bovino sem interposição de membrana de colágeno subjacente à membrana sinusal.

- **Lado Teste**: Enxerto de osso mineral bovino com interposição de membrana de colágeno subjacente à membrana sinusal.

Animais

Dezoito coelhos *New Zealand* (6 por tempo experimental), ficaram alojados no Biotério I da FORP nas seguintes condições: 1 animal/4500 cm², ar-condicionado *Split*, sem controle de umidade, 27,34 trocas de ar/hora, controle de iluminação automático 12/12hs, ração e água *ad libitum*, com as seguintes barreiras sanitárias: autoclave, banheiros/sanitários/vestiário e tela para controle de insetos.

Procedimento Cirúrgico

Os animais foram pré-anestesiados com acepromazina (1mg/kg) via subcutânea, quinze minutos antes da cirurgia. A anestesia foi com xilazina (3 mg/kg) e quetamina (60 mg/kg) por via intramuscular. Após a anestesia, os animais receberam oxitetraciclina (20 mg/Kg) via subcutânea e nos três dias após a cirurgia. Também receberam cetoprofeno via intra-muscular (3 mg/kg) a cada 12h, e cloridrato de tramadol, via subcutânea (1 mg/kg) a cada 12h, por 2 dias. Todas as cirurgias foram realizadas dentro de padrões assépticos e sempre pelo mesmo operador. A tricotomia do sítio cirúrgico foi realizada e a área será desinfetada com iodo Polivinilpirrolidona (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto). Uma incisão de aproximadamente 3,5 cm de comprimento foi realizada ao longo da linha média do dorso nasal e, após divulsão das bordas, o osso nasal foi exposto em ambos os lados da sutura nasoincisa, até à linha da sutura frontonasal (Fig.1a).

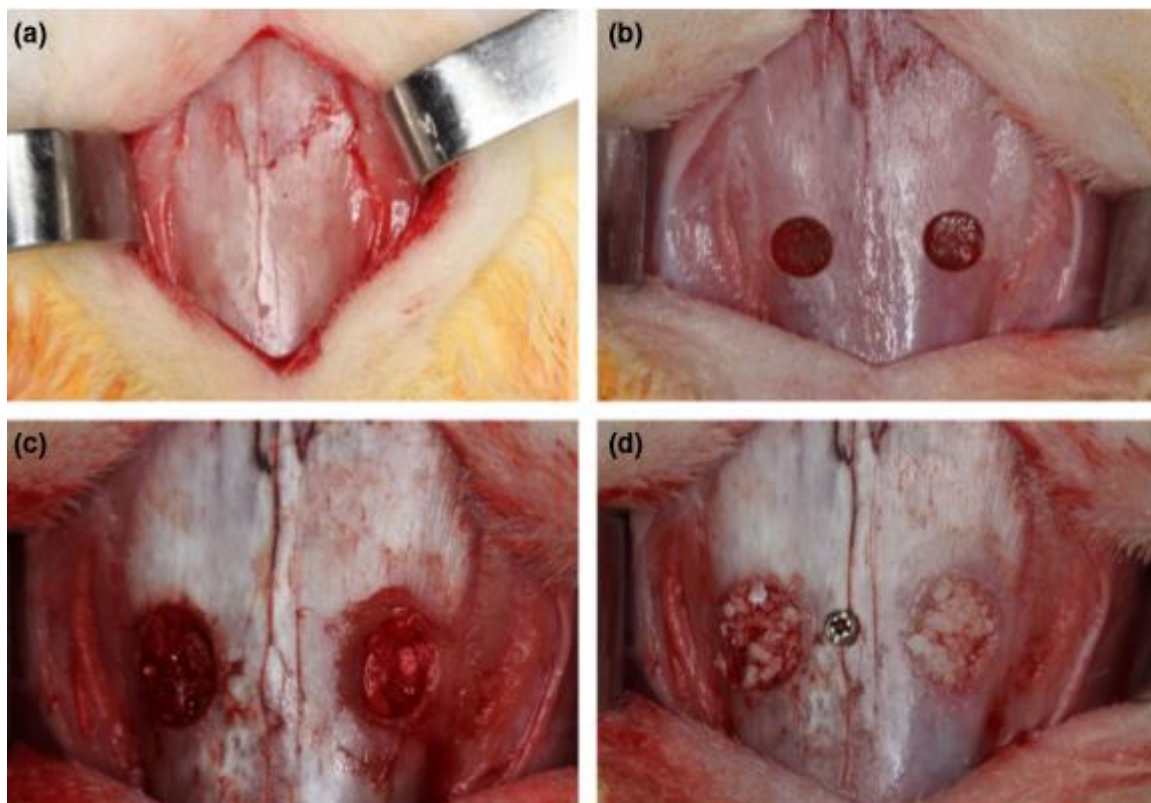


Fig. 1. Imagens do procedimento cirúrgico. (a) Os retalhos foram posicionados de modo a expor o osso nasal, bilateralmente à sutura incisal. (b) Trefinas foram usada para realizar a osteotomia. (c) No lado teste, uma pequena membrana de colágeno foi posicionada subjacente a mucosa sinusal. (d) Osso suíno particulado foi colocado abaixo do espaço elevado.

Janelas ósseas quadradas com 5mm x 5mm foram preparadas bilateralmente com o uso de instrumentos rotatórios de baixa rotação e brocas diamantadas esféricas 1 cm lateralmente à linha média e 2 cm anteriormente à linha de sutura frontonasal (Fig. 1b). Em seguida, a janela óssea foi removida. Quando a mucosa sinusal esteve completamente exposta, foi descolada cerca de 5 mm ao redor da osteotomia. Após elevação da mucosa, antes da colocação do material de preenchimento, uma membrana foi colocada subjacente à mucosa do seio em um dos lados escolhidos aleatoriamente (Fig. 1c). Os sítios foram preenchidos com Gen-Os (Tecross Dental srl, Pianezza, TO, Itália), bilateralmente (Fig. 1d). Um pino foi posicionado como referência na sutura nasoincisal, ao nível do centro das duas osteotomias. Uma membrana de colágeno

(Evolution, Tecnos Dental srl, Pianezza, TO, Itália) foi colocada para cobrir a osteotomia nos dois lados. O perióstio foi suturado com Poliglactyna 910 5-0 (Vicryl 5-0®, Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil) e as bordas foram posteriormente suturadas com nylon (Ethilon 5-0®, Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil).

Cuidados pós-operatórios

Foi dada atenção diária às funções biológicas básicas de alimentação e excreção, aos sinais de comportamento em relação à dor pós-operatória, monitorização de infecções pós-cirúrgicas e observação das incisões cirúrgicas quanto à deiscência da sutura ou sangramentos.

Eutanásia

Seis animais foram eutanasiados nos períodos de 2, 4 e 8 semanas pós-operatórias, por meio de overdose de Tiopental (1g, 2ml) administrado por via endovenosa, após pré-anestesia com acepromazina (1 mg/kg) via intra-muscular e anestesia com xilazina (10 mg/kg) e quetamina (50 mg/kg) por via intramuscular. A eutanásia foi realizada sob supervisão do veterinário do Biotério I da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Processamento histológico

Blocos individuais contendo os sítios experimentais e os tecidos circundantes foram fixados em solução de formaldeído a 4%, seguido por desidratação em uma série crescente de soluções de álcool e, finalmente, embebida em resina (LR White® hard grade, London Resin Company Ltd., Berkshire, Reino Unido). Os blocos foram cortados através do centro do pino de referência usando uma serra de diamante montados em uma máquina de corte de precisão (Exakt®, Apparatebau, Norderstedt, Alemanha) e, em seguida, reduzidos a uma espessura de cerca de 50 µm utilizando um dispositivo de desagste (Exakt®, Apparatebau, Norderstedt, Alemanha). De cada bloco, uma ou duas lâminas histológicas da parte central dos implantes foi preparada e, em seguida, coradas

com azul de Stevenel e vermelho de alizarina e examinada sob um microscópio de luz padrão para análise histométrica.

Avaliação histomorfométrica

As medidas lineares foram realizadas em três diferentes áreas, duas vezes, e um valor médio foi usado. Antes da mensuração morfométrica, o examinador foi submetido a um treinamento para reconhecimento dos tecidos. Após o treinamento, os valores de kappa para o intra-examinador foi de, aproximadamente, 0,89, variando de 0,83 a 0,96.

Os cortes foram examinados em um microscópio Eclipse Ci (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) equipado com uma câmera digital (Digital Sight DS- 2Mv, Nikon Corporation) conectada a um computador para medições histológicas.

A área elevada foi definida como o sítio delimitado pelo interior do contorno da mucosa sinusal (membrana epitelial e lâmina própria), as paredes do osso do seio e o interior do contorno da osteotomia. A área avaliada foi definida como a região não ocupada pela membrana de colágeno do sítio elevado. As regiões do espaço elevado e do ocupado pela membrana foram avaliadas em um aumento de x20.

A amplitude da membrana subjacente a mucosa sinusal e a colocada sob a osteotomia foi mensurada em três diferentes posições, equidistantes entre si e entre o limite da membrana, em um aumento de x40. Um valor médio foi calculado para cada membrana. A área ocupada pelo biomaterial fora da zona da osteotomia também foi avaliada nos lados teste e controle em um aumento de x40.

A amplitude da mucosa sinusal (excluindo o periósteo) foi medida em três sítios preservados do seio, e três diferentes posições, equidistantes entre si e a extremidade marginal do sítio elevado, em um aumento de x200. Um valor médio foi estimado para as duas áreas e a mucosa elevada.

Foram avaliadas a composição dos tecidos presentes no espaço da membrana do seio elevado e da osteotomia da janela de acesso expressa em porcentagens. Novo

osso, tecido conjuntivo e biomaterial remanescente foram identificados e mensurados com o software NIS- Elements D (v 4,0, Laboratory Imaging Nikon Corporation).

Um processo de contabilização foi utilizado para determinar a composição tissidual em cada região (Schroeder & Munzel-Pedrazzoli, 1973). Para isso, uma trama quadrangular com 75µm de medida, foi sobreposto ao tecido em um aumento de x100. Diversas tramas foram utilizadas durante toda análise.

A conexão direta do microscópio com o computador permitiu analisar os sítios com maior aumento quando necessário. As porcentagens de osso novo mineralizado, espaços medulares (em vários períodos de maturação, matriz densa, tecido frouxo, tecido conjuntivo, infiltrado de células inflamatórias, vasos, áreas contendo unidades multinucleadas e biomaterial (Gen-Os), e membrana colágena foram examinadas em quatro diferentes zonas.

Análise Estatística de dados

Os valores médios e o intervalo de 95% de confiança foram calculados para cada desfecho variável. O principal desfecho variável na avaliação histomorfométrica foi na área elevada, enquanto na medida morfométrica, foi a porcentagem de osso novo formado.

O software IBM SPSS Statistic (IBM Inc., Chicago, IL, USA) foi usado na análise experimental. O teste-t foi utilizado para avaliar as diferenças entre os sítios teste e controle. O nível de significância foi de 5%.

Em um estudo clínico (Barone et al., 2013), a medição histomorfométrica revelou que osso neoformado era de 30,7% ± 15,5% e o tecido conjuntivo foi de 50,6% ± 18,7% do volume total de uma janela óssea de cerca de 10 mm de altura. Pode ser especulado que a introdução de diferentes variáveis, tais como aquelas relatadas no presente protocolo, podem obter uma variação nas porcentagens de novo osso e tecido conjuntivo de cerca de 10% entre o teste e de controle, o que pode ser de 35% e 25% para osso e 55% e 45% para o tecido conjuntivo, respectivamente. Além disso, um desvio padrão

inferior é esperado em animais que são muito semelhantes entre si, em comparação com o estudo em humano reportado acima.

Então, para $\alpha = 0,05$, poder de 0,8, desvio-padrão de 7%, teste de dois lados, uma amostra composta por 6 animais por período de reparo pode ser suficiente para demonstrar diferenças, se existirem (<http://stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html>). Assim, para o experimento, 18 animais foram utilizados, e para cada período de reparo um $n = 6$ foi definido. A principal variável é a porcentagem de osso neoformado no espaço do seio elevado.

As diferenças entre os lados teste e controle foram analisadas por meio do teste de Wilcoxon para observações pareadas. As diferenças entre os períodos de reparo foram analisados através de análise de variância ANOVA. O nível de significância é de 0,05.

Resultados:

Durante os procedimentos cirúrgicos, as pequenas perfurações (menores do que 1mm) ocorreram em um sítio teste no grupo de oito semanas, e um sítio teste e um sítio controle no grupo de quatro semanas. A perfuração no grupo controle permaneceu sem tratamento. Nenhum dos animais mostraram complicações durante o período de reparo. Todos os cortes histológicos estiveram disponíveis para avaliação histológica, sendo assim um n-6 foi obtido para todos os períodos de avaliação, isto é, 2, 4 e 8 semanas de reparo.

Valores de média, mais ou menos desvio padrão, estão repostados no texto. Nas tabelas de 1 a 3, valores de média, diferença entre médias, intervalo de confiança e valores de p são reportados.

Tabela 1. Componentes teciduais após 2 semanas de reparo

Variable	Area	Test site	Control site	Mean difference	Lower 95%	Upper 95%	P-value
Mineralized bone	Available	8.90	6.17	-2.73	-6.42	0.95	0.1147
	Elevated	7.05	6.17	-0.88	-4.48	2.71	0.5551
Marrow spaces	Available	0.85	0.43	-0.42	-1.10	0.27	0.1785
	Elevated	0.50	0.43	-0.07	-0.48	0.35	0.6952
Loose matrix	Available	24.32	19.53	-4.78	-14.99	5.43	0.2823
	Elevated	20.67	19.53	-1.13	-9.21	6.94	0.7330
Dense matrix	Available	26.95	29.05	2.10	-5.44	9.64	0.5058
	Elevated	23.28	29.05	5.77	-1.12	12.65	0.0840
Gen-Os	Available	29.53	35.20	5.67	-4.82	16.16	0.2336
	Elevated	30.9	35.2	4.3	-3.4	12.0	0.2102
Membrane	Available	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	Elevated	10.02	0.00	-10.02	-13.72	-6.31	0.0009
PMN	Available	0.57	0.18	-0.38	-1.22	0.46	0.2939
	Elevated	0.40	0.18	-0.22	-0.52	0.08	0.1224
Vessels	Available	5.10	4.52	-0.58	-3.91	2.75	0.6714
	Elevated	4.03	4.52	0.48	-2.02	2.99	0.6406
Multinucleated cell zone	Available	3.80	4.92	1.12	-1.18	3.42	0.2672
	Elevated	3.08	4.92	1.83	-0.78	4.44	0.1309

Bold value indicates P <0.05.

Tabela 2. Componentes teciduais após 4 semanas de reparo

Variable	Area	Test site	Control site	Mean difference	Lower 95%	Upper 95%	P-value
Mineralized bone	Available	19.78	11.65	-8.13	-23.57	7.31	0.2337
	Elevated	11.58	11.65	0.07	-7.88	8.01	0.9836
Marrow spaces	Available	7.82	4.88	-2.93	-10.09	4.22	0.3402
	Elevated	4.23	4.88	0.65	-5.56	6.86	0.7985
Loose matrix	Available	23.05	28.23	5.18	-6.08	16.44	0.2899
	Elevated	15.10	28.23	13.13	3.16	23.10	0.0195
Dense matrix	Available	22.90	26.97	4.07	-4.37	12.50	0.2702
	Elevated	16.13	26.97	10.83	3.56	18.10	0.0122
Gen-Os	Available	17.10	18.22	1.12	-6.29	8.52	0.7142
	Elevated	14.62	18.22	3.60	-6.04	13.24	0.3813
Membrane	Available	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	Elevated	24.23	0.00	-24.23	-35.51	-12.95	0.0027
PMN	Available	1.18	0.00	-1.18	-4.23	1.86	0.3632
	Elevated	8.48	0.00	-8.48	-22.27	5.30	0.1746
Vessels	Available	4.17	6.23	2.07	-2.90	7.03	0.3333
	Elevated	3.08	6.23	3.15	-0.42	6.72	0.0724
Multinucleated cell zone	Available	4.02	3.80	-0.22	-2.71	2.28	0.8322
	Elevated	2.52	3.80	1.28	-0.09	2.66	0.0617

Bold value indicates P <0.05.

Tabela 3. Componentes teciduais encontrados após 8 semanas de reparo

Variable	Area	Test site	Control site	Mean difference	Lower 95%	Upper 95%	P-value
Mineralized bone	Available	27.28	26.72	-0.57	-11.19	10.05	0.8963
	Elevated	18.22	26.72	8.50	-1.49	18.49	0.0804
Marrow spaces	Available	19.43	28.42	8.98	-9.48	27.45	0.2664
	Elevated	11.67	28.42	16.75	-1.95	35.45	0.0695
Loose matrix	Available	21.13	14.97	-6.17	-24.99	12.66	0.4382
	Elevated	15.65	14.97	-0.68	-18.54	17.18	0.9255
Dense matrix	Available	16.33	15.12	-1.22	-7.61	5.18	0.6456
	Elevated	13.98	15.12	1.13	-7.01	9.27	0.7350
Gen-Os	Available	7.85	9.62	1.77	-2.55	6.08	0.3409
	Elevated	6.88	9.62	2.73	-2.02	7.49	0.1996
Membrane	Available	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	Elevated	24.52	0.00	-24.52	-36.74	-12.30	0.0036
PMN	Available	2.18	0.00	-2.18	-5.75	1.38	0.1759
	Elevated	4.82	0.00	-4.82	-10.32	0.69	0.0744
Vessels	Available	5.05	4.33	-0.72	-4.89	3.45	0.6771
	Elevated	3.75	4.33	0.58	-2.77	3.94	0.6739
Multinucleated cell zone	Available	0.70	0.83	0.13	-0.15	0.41	0.2739
	Elevated	0.48	0.83	0.35	-0.22	0.92	0.1753

Bold value indicates P <0.05.

Avaliação histométrica

A área elevada diminuiu progressivamente durante o período de reparo, tanto no lado controle, como no lado teste. Nos lados testes, esta área foi de $11,8 \pm 2,2$, $12,3 \pm 1,1$ e $8,8 \pm 1,5 \text{mm}^3$ após 2, 4, 8 semanas respectivamente (Fig. 2a-c e 3a-c). A contração entre duas e oito semanas foi de aproximadamente 25%. Nos lados controle, os respectivos valores foram $10,0 \pm 1,4$, $7,0 \pm 1,0$ e $5,3 \pm 1,3 \text{mm}^3$. A contração entre 2 e 8 semanas foi aproximadamente 47% (Fig. 4). As diferenças entre o lado teste e controle foram estatisticamente significantes em 4 e 8 semanas de reparo.

Nos lados teste, a membrana de colágeno subjacente a mucosa sinusal, apareceu em várias circunstâncias dobrada com 2 semanas de observação (Fig. 2a), ocupando uma área de $3,3 \pm 1,4 \text{mm}^2$. Representando aproximadamente 28% da área total. No período de 4 semanas de avaliação, a área aumentou comparado ao período de 2 semanas de avaliação, sendo $3,9 \pm 1 \text{mm}^2$ e representando aproximadamente 32% da área total. Em alguns casos, a membrana de colágeno apareceu como uma massa uniforme, com alguns sinais de infiltrado celular inflamatório e degradação. Em outros espécimes, estava dobrada deslocando o biomaterial (Fig. 2b). Após 8 semanas de

reparo, os processos reabsortivos estavam evidentes resultando na contração da membrana para apenas $2,0 \pm 1,7 \text{ mm}^2$. Isso representou aproximadamente 22% da área total (Fig. 2c).

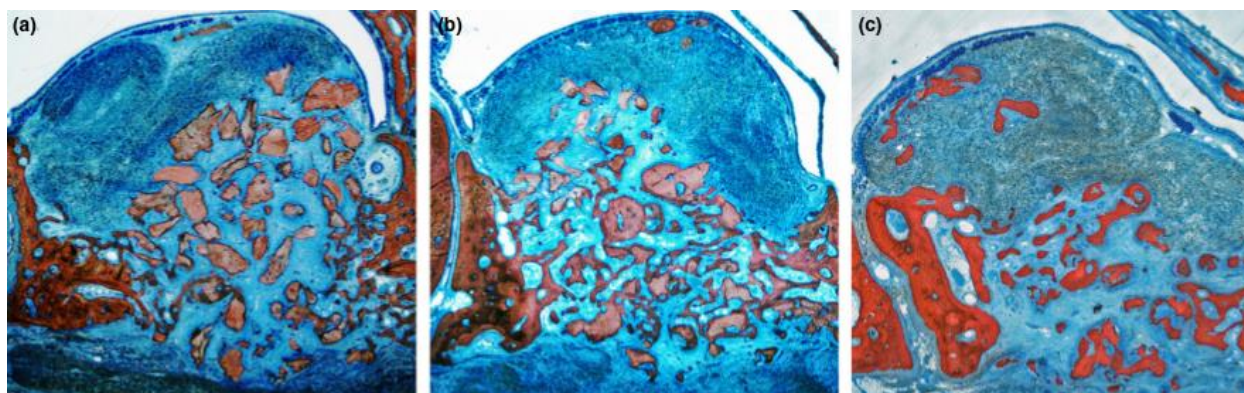


Fig 2. Fotomicrografia da secção da base do sítio teste após (a) 2, (b) 4 e (c) 8 semanas de reparo. A formação óssea pareceu ter início nas paredes do seio. As membranas muitas vezes foram encontradas dobradas. A contração da área elevada disponível foi observada. Vermelho de alizarina e azul de Stevenel foram usados como tintura. Aumento original de 20x.

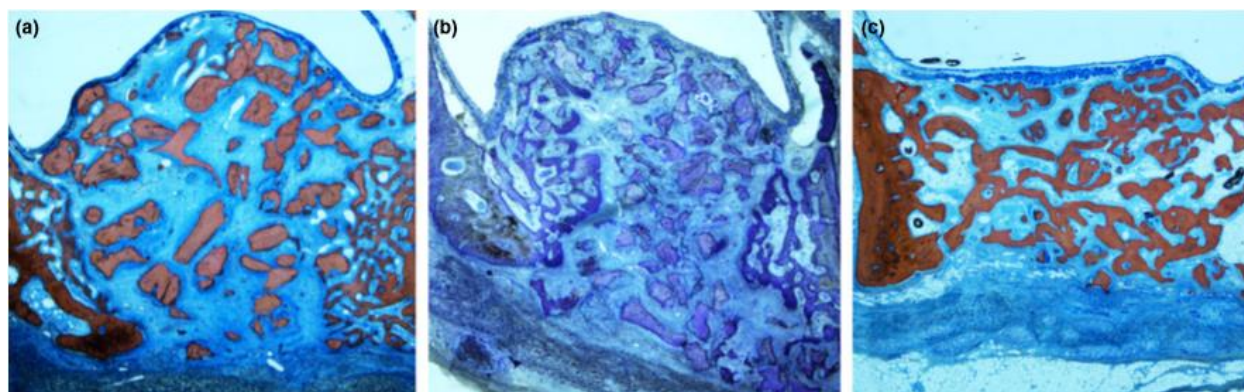


Fig 3. Fotomicrografia da secção da base do sítio teste após (a) 2, (b) 4 e (c) 8 semanas de reparo. Osso novo foi encontrado sendo formado a partir das paredes ósseas do seio. A contração da área elevada disponível foi observada. Vermelho de alizarina e azul de Stevenel foram usados como tintura. Aumento original de 20x.

A área disponível nos lados teste foi de $8,5 \pm 2,1$, $8,4 \pm 2,6$, e $6,7 \pm 0,9 \text{ mm}^2$ após 2, 4 e 8 semanas de reparo. A contração entre 2 e 8 semanas foi de aproximadamente 21%. A área disponível no lado teste após 2 semanas de reparo foi menor comparada a área total dos lados controle e a diferença foi estatisticamente significante.

Entretanto, em 4 e 8 semanas a área disponível foi estatisticamente maior nos lados teste comparado aos lados controles.

A espessura da membrana de colágeno usada no presente estudo foi de 0,3mm como declarado pelo fabricante. A espessura da membrana posicionada abaixo da membrana sinusal foi maior comparada a dimensão original, sendo $0,6 \pm 1,0$, $0,8 \pm 0,2$ e $0,5 \pm 0,2$ após 2, 4 e 8 semanas respectivamente. Um padrão similar foi observado para as membranas colocadas no lado teste ($0,5 \pm 0,1$, $0,7 \pm 0,1$, $0,3 \pm 0,1$ mm), e no lado controle ($0,5 \pm 0,1$, $0,7 \pm 0,1$, $0,3 \pm 0,1$) após 2, 4 e 8 semanas respectivamente. Não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os lados teste e controle.

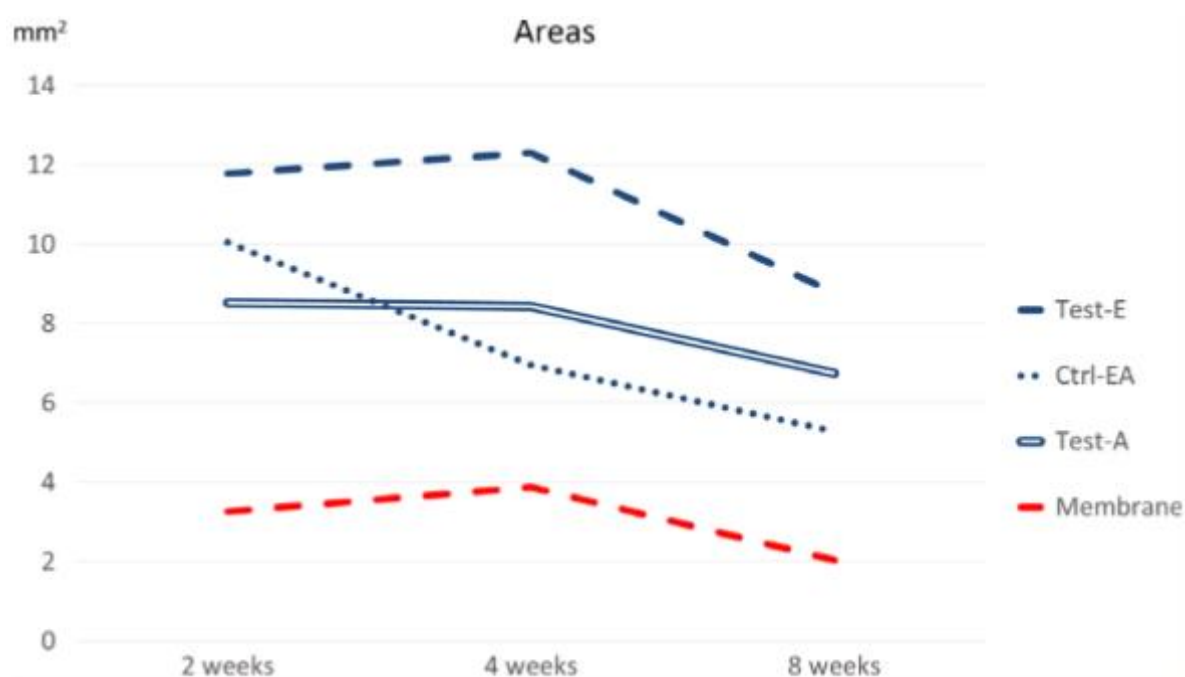


Fig. 4. Gráfico representando a variação dimensional das áreas elevada (E) e disponível (A), nos sítios teste (test) e controle (ctrl).

As áreas ocupadas pelo biomaterial, fora da área de osteotomia, foram $10,0 \pm 0,8$, $0,6 \pm 0,6$, e $0,0 \pm 0,0$ após 2, 4 e 8 semanas de reparo. Os respectivos valores para o lado controle foram $0,6 \pm 0,5$, $0,4 \pm 0,7$ e $0,3 \pm 0,5$. Nenhuma das diferenças encontradas entre os lados teste e controle são diferenças estatisticamente significantes.

A espessura da mucosa sinusal do lado teste foi de $71,0 \pm 11,0$, $89,0 \pm 15,0$ e $84,0 \pm 15,0$ micrômetros, nos lados controle após 2, 4 e 8 semanas de reparo, respectivamente, enquanto no lado controle foi de $74,0 \pm 20,0$, $76 \pm 10,0$, e $79 \pm 13\mu\text{m}$, respectivamente. Nenhuma diferença entre o lado teste e controle foi estatisticamente significativa. O valor médio da amplitude da mucosa sinusal ao longo das diversas medições variou entre $81,0 \pm 9,0$ e $77,0 \pm 2,0\mu\text{m}$ nos lados teste e controle, respectivamente.

A amplitude da mucosa elevada era de $91,0 \pm 17,0$, $114,0 \pm 35,0$, $182,0 \pm 53,0\mu\text{m}$ no lado controle após 2,4 e 8 semanas de reparo, respectivamente. As dimensões aumentadas atribuídas a lamina própria, que apresentou uma clara proliferação de glândulas comparada a membrana (Fig. 5a,b). As diferenças entre os lados teste e controle não alcançaram diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos períodos avaliados. Entretanto, as diferenças entre a espessura da mucosa sinusal e daquela elevada foram estatisticamente significantes para todos os períodos de reparo, tanto para os lados teste como para os lados controle.

Avaliação morfométrica

- 2 semanas de reparo

Após 2 semanas de reparo uma pequena quantidade de osso novo mineralizado foi encontrada na região elevada, tanto no lado teste ($7,0 \pm 2,7\%$) como no controle ($6,2 \pm 2,7\%$). Dentro da área disponível no lado controle o osso mineralizado alcançou $8,9 \pm 3,2\%$ (Fig. 6). A zona com maior formação óssea estava em íntimo contato com as paredes ósseas (Fig. 7a). Pequenas porcentagens de espaços medulares (menor que 1%) foram observados nesse estágio, nos dois lados. Na região elevada, o material de enxerto estava presente nas porcentagens de $30,9 \pm 4,4\%$ no lado teste e $35,2 \pm 7,3\%$ no lado controle. O biomaterial estava, principalmente, incorporado a matriz, rica em fibroblastos que apresentaram dois tecidos de diferentes densidades em células e fibras. A matriz densa estava circundando as partículas do enxerto em íntimo contato

com elas, enquanto a matriz solta apresentava-se com aspecto estromal e estava interposta entre as partículas do biomaterial (Fig. 7b). A porcentagem de matriz densa na região elevada foi de $23,3 \pm 3,3\%$ e $29,0 \pm 4,6\%$, e na matriz solta foi de $20,7 \pm 5,3\%$ e $19,5 \pm 5,0\%$, nos lados teste e controle, respectivamente. Osso mineralizado foi encontrado na superfície de algumas partículas em contato com as paredes ósseas (Fig. 7c). Várias células multinucleadas foram encontradas abrangendo as partículas do enxerto nas porcentagens de $3,1 \pm 1,7\%$ e $4,9 \pm 3,0\%$, nos lados teste e controle, respectivamente (Fig. 7d). Vasos foram encontrados na porcentagem de, aproximadamente, 4% nos dois grupos, enquanto infiltrado de células inflamatórias foi raramente visto (menos que 0,5%). A membrana de colágeno ocupava cerca de $10,0 \pm 3,5\%$ da região elevada e estava ocupando, principalmente, a região subjacente a mucosa sinusal. Considerando toda área, apenas as diferenças entre a densidade da matriz e a membrana de colágeno apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os lados testes e controle.

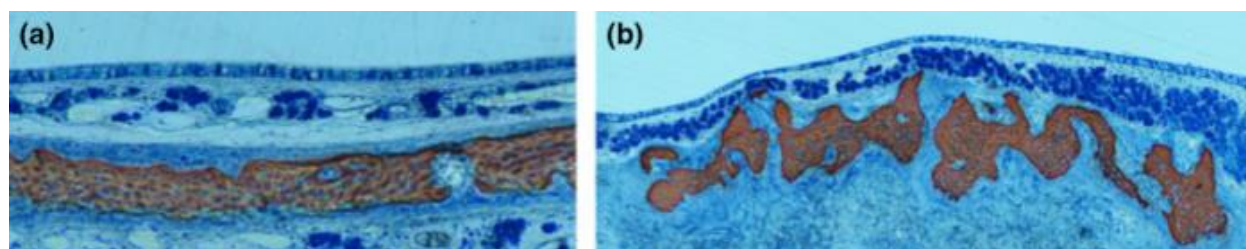


Fig. 5 (a) Mucosa sinusal normal na aumento de 200x. (b) Proliferação de glândulas submucosa na membrana sinusal no lado controle, após 8 semanas de reparo. Azul de Stevenel e vermelho de alizarina foram usados. Aumento de 100x.

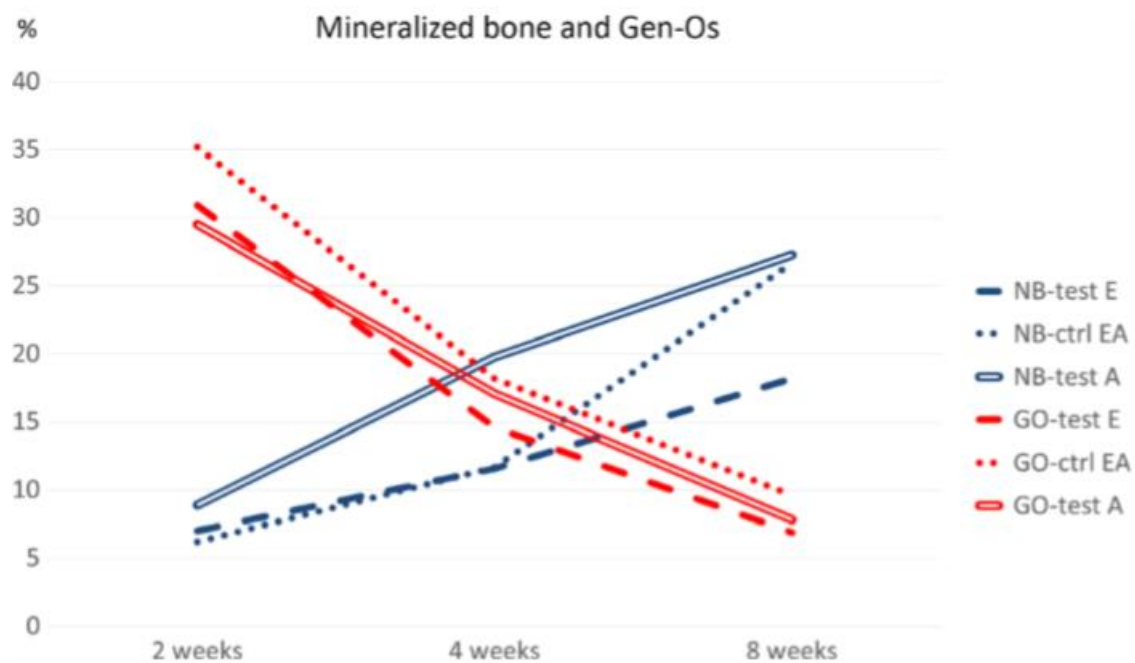


Fig. 6. Gráfico representando as porcentagens de osso novo mineralizado e enxerto ósseo xenógeno nos períodos analisados na área elevada (E) e disponível (A), nos sítios teste e controle (ctrl).

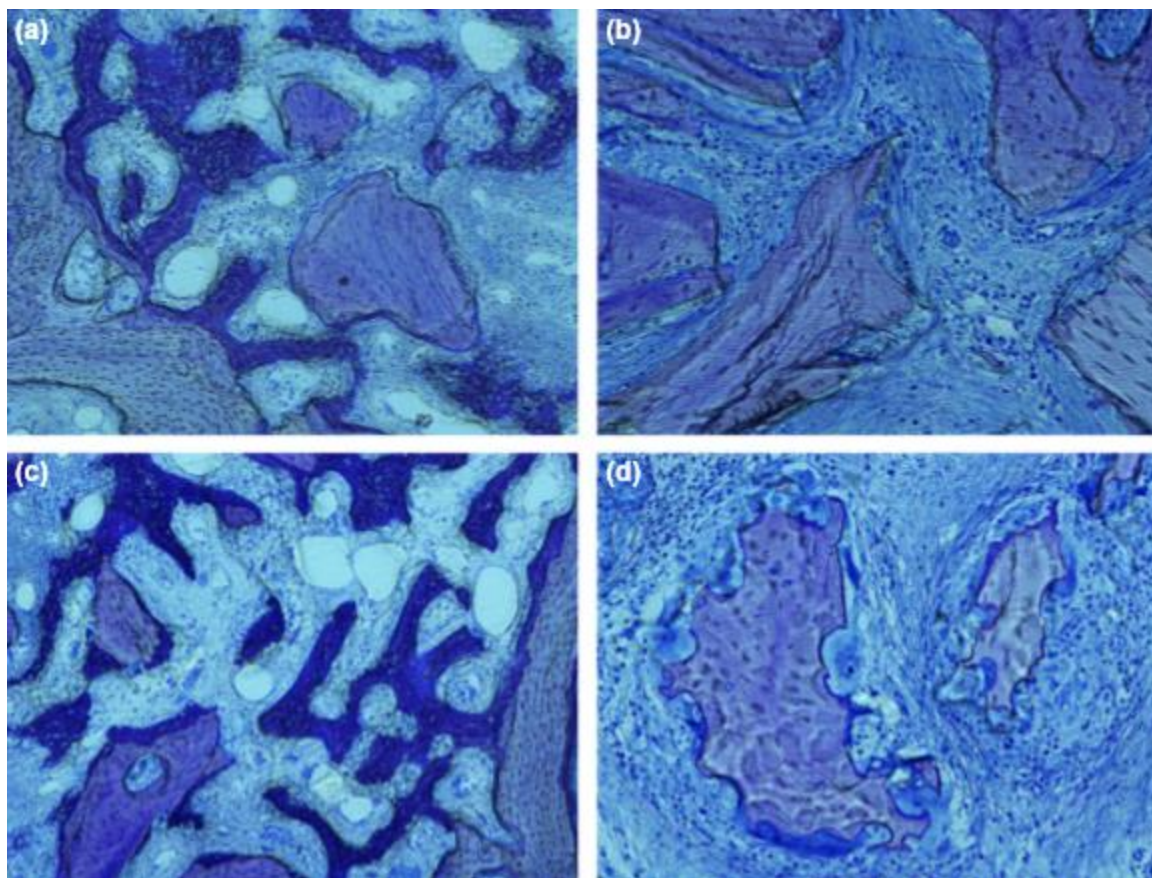


Fig. 7. Fotomicrografia da secção da base dos sítios teste após 2 semanas de reparo. Padrões semelhantes de reparo foram observados nas áreas disponíveis em ambos lados, teste e controle. (a) Osso novo formado nas paredes ósseas do seio. (b) Matriz densa e solta cercando o enxerto. (c) Osso novo acoplado ao enxerto. (d) Células multinucleadas na superfície do biomaterial. Azul de toluidina. Aumento de 100x em a e c, 200x em b e d.

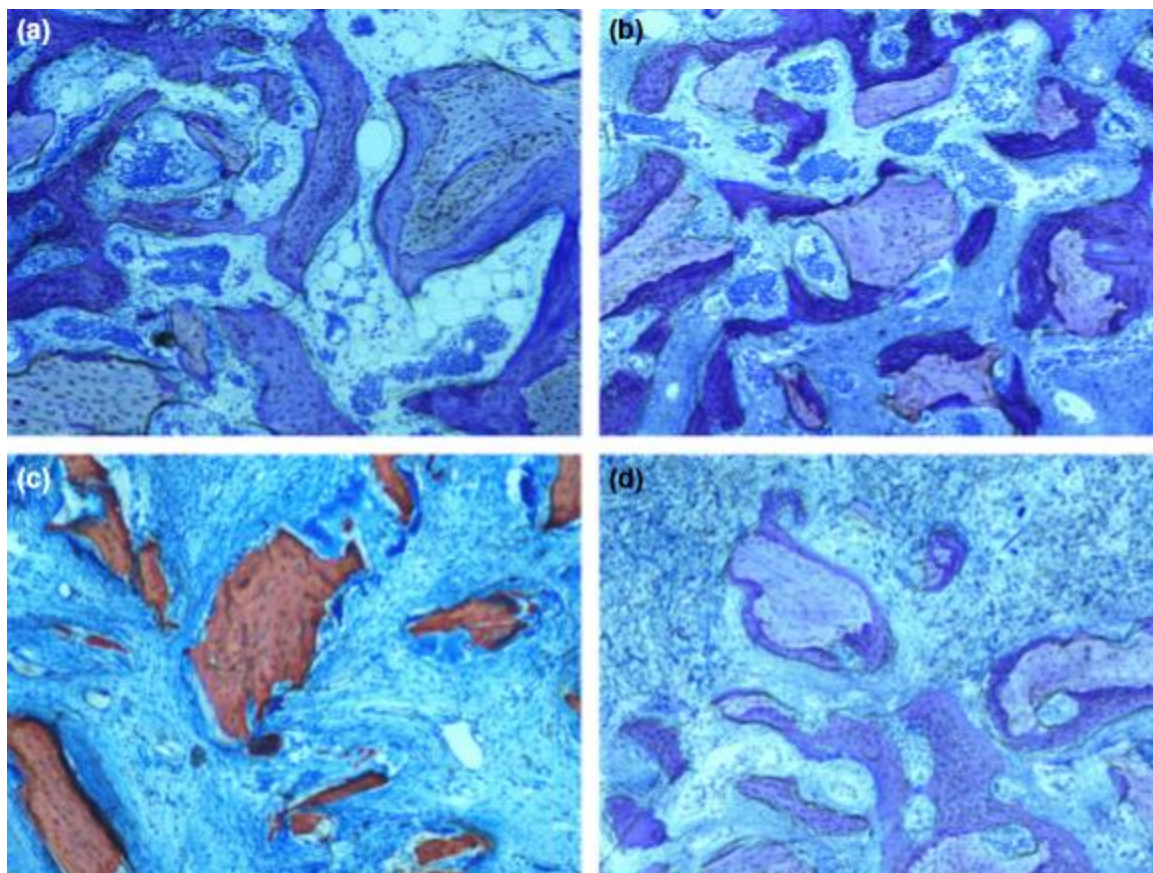


Fig. 8. Fotomicrografia da secção da base dos sítios após 4 semanas de reparo. Padrões semelhantes de reparo foram observados em ambos sítios teste e controle. (a) Osso novo sendo formado e espaços medulares. (b) Novo osso mineralizado em contato com o biomaterial. (c) Tecido denso e solto e células multinucleadas cercando o biomaterial. (d) Resíduos de membrana sob o osso novo em formação e biomaterial. a,b,d azul de toluidina. c azul de Stevenel e vermelho de alizarina, Aumento de 100x.

- 4 semanas de reparo

Após 4 semanas de reparo, na região elevada, novo osso mineralizado e osso neoformado aumentaram em porcentagens de 11,6 +/- 11,3% e 15,8 +/- 15,5% no lado teste, e 11,7 +/- 6,4% e 16,6 +/- 12,7% no lado controle, respectivamente. Dentro da disponível região do lado teste, os respectivos valores foram 19,8 +/- 19,0% e 27,6 +/- 26,7% (Fig. 6). Novos espaços medulares e ossos neoformados foram encontrados, principalmente, perto das paredes ósseas, tanto no lado teste, como no lado controle, muitas vezes em contato com as partículas de enxerto (Fig. 8a). Menores quantidades de osso neoformado foram encontradas na região central da zona elevada, enquanto

muita pouca quantidade de osso foi encontrada na região abaixo da mucosa sinusal, em ambos lados, teste e controle. Não houveram diferenças estatisticamente significantes. O enxerto xenógeno foi encontrado em contato com ossos neoformados (Fig. 8b) e sua porcentagem diminuiu pela metade, quando comparado ao período de 2 semanas de reparo, a porcentagem alcançada na região elevada foi de n 14,6 +/- 7,0% e 18,2 +/- 4,9%, nos lados teste e controle, respectivamente. As partículas, ainda, encontravam-se cercadas pela matriz densa, interposta entre matriz solta e as partículas (Fig. 8c). As respectivas porcentagens foram de 16,1 +/- 4,4% e 15,1 +/- 5,6%, no lado teste e 27,0 +/- 6,0% e 28,2 +/- 6,7% no lado controle. Partículas com células multinucleadas ainda foram encontrados em torno do material xenógeno nas porcentagens de 2–4% em ambos grupos (Fig. 8c). Infiltrados de células inflamatórias estavam ausentes no lado controle, enquanto no lado teste foram encontrados em 8.5%, localizados, predominantemente, nas regiões submucosa. Foi observada a presença de vasos em, aproximadamente, 3% no lado teste e 6% no lado controle. A membrana de colágeno apresentou áreas de degradação e ocupou uma área de 24,2 +/- 10,7% da área elevada, nas proximidades da mucosa sinusal (Fig. 8d), considerando toda área elevada, diferenças estatisticamente significantes foram encontradas para matriz densa e solta e para membrana e infiltrado inflamatório, enquanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada dentro da região.

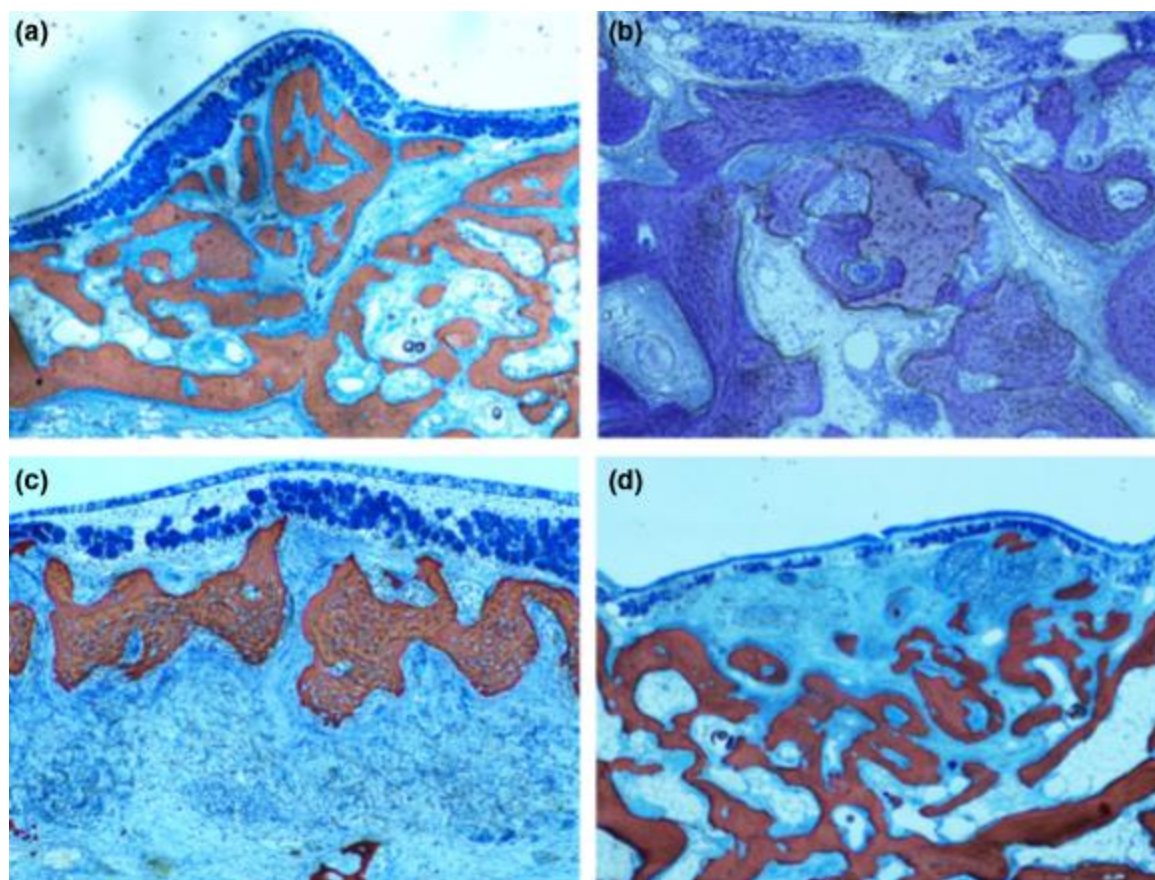


Fig. 9 Fotomicrografia da secção da base dos sítios após 8 semanas de reparo. Padrões semelhantes de reparo foram observados em ambos sítios teste e controle. (a) Reparo dentro da área elevada no sítio controle. (b) Tecido denso e solto cercando o biomaterial no sítio controle. (c) Osso novo sendo formado entre a mucosa sinusal e a membrana de colágeno no sítio teste. (d) Resíduos de membrana sob o osso novo formado mineralizado no sítio teste. a,c,d, azul de Stevenel vermelho de alizarina usados como corante. Aumento original a 40x, b,c 100x, d 20x.

- 8 semanas de reparo

Após 8 semanas de reparo a quantidade de novo osso mineralizado encontrada foi inferior quando comparado ao lado controle, alcançando $18,2 \pm 5,5\%$ (Fig. 9a), enquanto a quantidade total de osso aumentou significativamente para $29,9 \pm 9,9\%$. As respectivas porcentagens dos lados teste e controle foram $26,7 \pm 7,7\%$ e $51,1 \pm 24,1\%$ (Fig. 6). Apenas a diferença de osso mineralizado foi estatisticamente significativa. Dentro da região disponível dos lados teste, novo osso mineralizado e quantidade total de osso foram de $27,3 \pm 7,0\%$ e $46,7 \pm$

13,0%, e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada no lado controle. O aumento de espaços medulares foi similar ao aumento de neoformação óssea. Matriz densa e solta ainda foram detectadas, apresentando, frequentemente, padrão similar ao descrito no período anterior de reparo (Fig. 9b). As porcentagens na área elevada foram de 14,0 +/- 4,8% e 15,7 +/- 4,5% no lado teste e 15,1 +/- 7,3% e 15,0 +/- 14,0% no lado controle, respectivamente. Zonas contendo células multinucleadas ainda foram detectadas envolvendo o material xenógeno, mas em uma porcentagem pequena (<1%) em ambos grupos, enquanto que infiltrado de células inflamatórias foi encontrado apenas no lado teste (4,8 +/- 5,2%), principalmente localizado na submucosa. Vasos foram encontrados em porcentagens de 4% em ambos lados. A membrana de colágeno continuou apresentando-se em porcentagens de 24,5 +/- 11,6%, localizada, principalmente, na submucosa e apresentava sinais evidentes de degradação (Fig. 9c,d).

Discussão:

O objetivo da presente análise foi avaliar a composição tecidual durante a reparo na elevação da mucosa sinusal com o uso de enxerto ósseo suíno e membrana de colágeno posicionada subjacente a mucosa sinusal. Para tanto, nos sítios teste, a membrana de colágeno foi posicionada abaixo da mucosa sinusal após a elevação do seio, enquanto o outro sítio foi deixado sem a membrana.

Entre 2 e 8 semanas, a área elevada foi reduzida em 25% no lado teste e 47% no lado controle. Um grande número de estudos tem mostrado que, após a elevação da mucosa sinusal, o aumento em volume da mucosa é perdido se nenhum procedimento for realizado para manter a área elevada. Como exemplo, em um estudo em coelhos (Caneva et al. 2016), a área que recebeu tratamento com osso bovino desproteínizado se manteve durante todo o período do estudo enquanto, os sítios preenchidos com uma esponja de colágeno, a área encontrada após 7 dias foi reduzida para 25% de suas dimensões originais após 21 dias.

Em outro experimento de elevação da mucosa sinusal, em mini porcos (Scala et al. 2015), o espaço preenchido com osso autógeno perdeu em altura de 8,9 a 3,9 mm entre 15 e 180 dias de reparo. Concluiu-se que a contração da área elevada é uma consequência da reabsorção do enxerto autógeno. No presente estudo, o biomaterial usado também foi reabsorvido, resultando em repneumatização parcial das áreas elevadas, principalmente nos lados controle. Nos lados teste, a contração foi reduzida pela presença da membrana de colágeno que não foi reabsorvida completamente no período de 8 semanas de reparo, apesar da sua degradação ter sido iniciada. Contudo, a área do sítio elevado também foi ligeiramente superior em comparação com o lado controle. Isto, por sua vez, significa que a membrana de colágeno contribuiu para manter a área do sítio elevado.

A membrana subjacente a mucosa parecia estar ondulada ou parcialmente dobrada após 2 semanas de reparo. Aspectos semelhantes foram vistos nos subsequentes períodos de reparo. Esse aspecto pode estar relacionado ao tamanho grande da membrana em relação a área dos sítios elevados, quando posicionada durante a cirurgia. Entretanto, o motivo também pode estar relacionado a reabsorção mais rápida do substituto ósseo comparado ao da membrana de colágeno e o subsequente colapso da área.

A espessura original da membrana de colágeno usada neste estudo era de 0,3mm. Contudo, a espessura aumentou para quase o dobro em 2 semanas, e atingiu 0,7-0,8mm após 4 semanas. Por fim, foi reduzida após 8 semanas devido ao processo de degradação da membrana.

Neste presente estudo, o biomaterial foi encontrado fora da osteotomia em ambos lados teste e controle, alcançando entre 1,0 e 0,6 mm² após 2 semanas. Isto pode ter ocorrido devido ao excesso de material colocado pelo cirurgião, ou pela migração do biomaterial pela janela devido a pressão interna do seio. A migração do material pela osteotomia após a elevação do seio tem sido retratado em estudos em humanos utilizando tomografia computadorizada de feixe cônico (Nosaka et al. 2015).

A largura da mucosa do seio virgem variou entre 71 e 89 µm. A largura foi encontrada mais espessa na mucosa elevada, nos dois grupos, entre 91-99 µm após 2 semanas, e

176-182 μm após 8 semanas. Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre a mucosa virgem e a elevada. Observou-se que o aumento de largura se deu na lamina própria, na qual ocorreu a proliferação de estruturas glandulares.

A análise morfométrica foi realizada para analisar o impacto proporcional dos componentes dos diferentes tecidos encontrados em diversos sítios da área elevada. Dos resultados pudemos notar que osso novo foi formado a partir do osso próprio das paredes do seio propagando-se para a região medial e submucosa. O fato de a mucosa sinusal não participar ativamente da neoformação óssea, principalmente nas fases iniciais de reparo, também é mostrado em outro estudo em animais (Scala et al. 2010, 2012). Neste experimento em macacos, foi demonstrado que o espaço criado após a elevação da mucosa sinusal foi diminuído progressivamente durante 30 dias de reparo até o colapso da membrana no corpo do implante. Osso novo foi formado a partir do osso parental, enquanto a mucosa sinusal não influenciou na indução da formação óssea na primeira fase de reparo. Foi demonstrado em estudos prévios a capacidade indutora da membrana de colágeno (Gruber et al. 2004; Srouji et al. 2009, 2010, 2013). Entretanto, os resultados do presente estudo *in vivo* não foram ao encontro com esta premissa.

Comparando os dados obtidos da área total elevada, notou-se que a formação óssea foi mais rápida no lado controle comparado ao lado teste e que a colocação da membrana de colágeno internamente interfere no processo de reparo do espaço criado. Todavia, deve ser considerado que uma grande parte da região elevada ainda estava ocupada pela membrana de colágeno posicionada subjacente a mucosa sinusal, principalmente na área submucosa. De forma inversa, comparando os dados obtidos da região disponível, que é a área não preenchida pela membrana, na qual havia a possibilidade de formação óssea, valores similares e padrões de reparo foram observados para ambos, osso novo e osso total. Isso significa que a colocação da membrana abaixo da mucosa sinusal não compromete o processo cicatricial da área elevada.

Este resultado está de acordo com estudos previamente mencionados, nos quais membranas foram colocadas subjacente a mucosa em ovelhas (Favero et al. 2016; Scala

et al. 2016). Em ambos estudos, concluiu-se que não há evidência da participação da mucosa na formação óssea.

O biomaterial usado neste presente estudo no período da segunda semana variou entre 31% e 35%, e diminuiu entre 7-10% na oitava semana, na área elevada. O processo de reabsorção ocorrido durante a reparo é justificado pela presença de um grande número de células multinucleadas nas lacunas de Howship que estavam cercado as partículas de biomaterial, principalmente no período de 2 e 8 semanas de reparo. O processo de reabsorção observado neste estudo possui aspectos semelhantes descritos no estudo com osso autógeno particulado usado na elevação de seio em mini porcos (Scala et al. 2015). Nesse experimento, após 15 dias de reparo, pouca quantidade de osso particulado foi encontrada (>10%). As partículas, caracterizadas por lacunas vazias, foram parcialmente integradas no osso novo ou circundadas por osteoclastos, denotando o processo de reabsorção ativo. O osso particulado, praticamente, desapareceu durante o restante do período de reparo.

No presente estudo, as partículas do biomaterial apresentavam-se cercadas por um tecido de matriz densa, enquanto um tecido de matriz solta foi encontrado interposto pelas partículas. Este achado foi previamente descrito em outro estudo em coelhos (Caneva et al. 2016) no qual uma matriz densa foi encontrada cercado as partículas de osso bovino desproteínizado e embebida na matriz solta. Foi mostrado ainda que, durante a reparo, a matriz densa foi tornando-se mineralizada de modo que o material do osso bovino possa integrar o osso novo formado. Entretanto, a matriz solta foi progressivamente transformada em espaços medulares. Isso, por sua vez, significa que o material de osso bovino desproteínizado garante uma atividade osteocondutora que permite com o tempo a aposição óssea ao redor do biomaterial dentro da área elevada. Ainda assim, após 8 semanas de reparo, algumas áreas ainda apresentavam desprovidas de osso neoformado, especialmente dentro da zona medial e por baixo da mucosa sinusal. Isso significa que um maior período de reparo é necessário quando osso bovino desproteínizado é utilizado em aumentos de volume ósseo, como demonstrado em estudos prévios (Stavropoulos et al. 2001; Donos et al. 2004; Calciolari et al. 2016).

Contudo, neste presente estudo, as partículas foram progressivamente reabsorvidas pelos osteoclastos, para que o biomaterial pudesse expressar sua capacidade de osteocondução apenas nas fases iniciais de reparo.

Pequenas áreas de degradação da membrana de colágeno foram vistas após 4 semanas, ainda que este processo seja mais evidente após 8 semanas de reparo. Todavia, após 8 semanas de reparo, a degradação era mais evidente ainda que, uma grande quantidade de resíduos de membrana foi encontrada. Conseqüentemente, pode-se dizer que o período de 8 semanas de reparo foi pequeno para completa reabsorção da membrana de colágeno.

Neste presente estudo, uma grande quantidade de vasos foi encontrada. Isso está de acordo com o estudo *in vitro* que mostrou altas taxas de proliferação de células endoteliais e formação de estruturas semelhantes a capilares em culturas com Gen-Os (Rombouts et al. 2016).

Conclusão

Pode-se concluir que a análise morfométrica de reparo do sítio elevado após a elevação da membrana sinusal foi semelhante com e sem a colocação da membrana colágena. Da mesma forma, o processo de reparo da região elevada não foi afetado pela colocação da membrana de colágeno.

Do ponto de vista clínico, mesmo que a colocação da membrana de colágeno abaixo da membrana sinusal não vá afetar negativamente o processo de reparo, o uso deste material na ausência de perfurações na elevação do seio deve ser considerado um custo extra desnecessário ao procedimento.

Além disso, deve-se notar que a reabsorção desta membrana irá exigir um tempo prolongado. Ademais, a inferência dos resultados deste estudo em animais em situações clínicas semelhantes deve ser cuidadosamente aplicado, já que é conhecido que a

reparo em animais filogeneticamente inferiores é mais rápida que em humanos. Estudos similares em humanos devem ser realizados para confirmar a hipótese levantada neste presente estudo em animais.

Referências Bibliográficas

Barone, A., Ricci, M., Covani, U., Nannmark, U., Azarmehr, I. & Calvo-Guirado, J.L. (2012) Maxillary sinus augmentation using prehydrated corticocancellous porcine bone: hystomorphometric evaluation after 6 months. *Clinical Implant Dentistry & Related Research* 14: 373– 379.

Boyne, P. J. & James R.A. (1980) Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *Journal of Oral Surgery* 38: 613-616.

Calciolari, E., Mardas, N., Dereka, X., Kostomitsopoulos, N., Petrie, A. & Donos, N. (2016) The effect of experimental osteoporosis on bone regeneration: Part 1, histology findings. *Clinical Oral Implants Research* 28: e101–e110.

Caneva, M., Lang, N.P., Garcia Rangel, I.J., Ferreira, S., Caneva, M., De Santis, E. & Botticelli, D. (2016) Sinus mucosa elevation using Bio-Oss or Gingistat collagen sponge: an experimental study in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* 28: e21–e30.

Corbella, S., Taschieri, S., Weinstein, R. & Del Fabbro, M. (2016) Histomorphometric outcomes after lateral sinus floor elevation procedure: a systematic review of the literature and metaanalysis. *Clinical Oral Implants Research* 27: 1106–1122.

Cosso, M.G., de Brito, R.B.Jr., Piattelli, A., Shibli, J. A. & Zenobio, E.G. (2013). Volumetric dimensional changes of autogenous bone and the mixture of hydroxyapatite and autogenous bone graft in humans maxillary sinus augmentation. A multislice tomographic study. *Clinical Oral Implants Research* [Epub ahead of print].

Cricchio, G., Imburgia, M., Sennerby, L. & Lundgren, S. (2013) Immediate Loading of Implants Placed Simultaneously with Sinus Membrane Elevation in the Posterior Atrophic Maxilla: A Two-Year Follow-Up Study on 10 Patients. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* [Epub ahead of print].

Cricchio, G., Palma, V.C., Faria, P.E., de Oliveira, J.A., Lundgren, S., Sennerby, L. & Salata, L.A. (2009) Histological findings following the use of a space-making device for bone reformation and implant integration in the maxillary sinus of primates. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 11 Supplement 1: 14-22

Cricchio, G., Palma, V.C., Faria, P.E., de Olivera, J.A., Lundgren, S., Sennerby, L. & Salata, L.A. (2011) Histological outcomes on the development of new space-making devices for maxillary sinus floor augmentation. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 13: 224-230.

De Santis, E., Lang, N.P., Ferreira, S., Rangel Garcia, I. Jr, Caneva, M. & Botticelli, D. (2017) Healing at implants installed concurrently to maxillary sinus floor elevation with Bio-Oss() or autologous bone grafts. A histo-morphometric study in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* 28: 503–511.

Donos, N., Lang, N.P., Karoussis, I.K., Bosshardt, D., Tonetti, M. & Kostopoulos, L. (2004) Effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical-size defects. *Clinical Oral Implants Research* 15: 101–111.

Ellegaard, B., Kolsen-Petersen, J. & Baelum, V. (1997) Implant therapy involving maxillary sinus lift in periodontally compromised patients. *Clinical Oral Implants Research* 8: 305-31.

Favero, V., Lang, N.P., Canullo, L., Urbizo Velez, J., Bengazi, F. & Botticelli, D. (2015) Sinus floor elevation outcomes following perforation of the Schneiderian membrane. An experimental study in sheep. *Clinical Oral Implants Research* 2015 Feb 25. Doi: 10.1111/crl.12576. [Epub ahead of print]

Gruber, R., Kandler, B., Fuerst, G., Fisher, M.b. & Watzek, G. (2004) Porcine sinus mucosa holds cells that respond to bone morphogenetic protein (BMP)-6 and BMP-7 with increased osteogenic differentiation in vitro. *Clinical Oral implants Research* 15: 575-580.

Kim, Y.K., Yun, P.Y., Oh, J.S. & Kim, S.G. (2014) Prognosis of closure of large sinus membrane perforations using pedicled buccal fat pads and a resorbable collagen membrane: case series study. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 40: 188–194.

Jensen, T., Schou, S., Svendsen, P.A., Forman, J.L., Gundersen, H.J., Terheyden, H. & Holmstrup, P. (2012) Volumetric changes of the graft after maxillary sinus floor augmentation with

Bio-Oss and autogenous bone in different ratios: a radiographic study in minipigs. *Clinical Oral Implants Research* 23: 902-910.

Johansson, L., Isaksson, S., Adolfsson, E., Lindh, C. & Sennerby, L. (2012) Bone regeneration using a hollow hydroxyapatite space-maintaining device for maxillary sinus floor augmentation – a clinical pilot study. *Clinical Implant Dentistry & Related Research* 14: 575-584.

John, H.D. & Wenz, B. (2004) Histomorphometric analysis of natural bone mineral for maxillary sinus augmentation. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 19: 199-207.

Kim, Y.K., Yun, P.Y., Oh, J.S. & Kim, S.G., (2014) Prognosis of closure of large sinus membrane perforations using pedicled buccal fat pads and a resorbable collagen membrane: case series study. *Journal of the Korean association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 40: 188-194.

Klijn, R. J., Meijer, G.J., Bronkhorst, E. M. & Jansen, J. A. (2010) Sinus Floor Augmentation Surgery Using Autologous Bone Grafts from Various Donor Sites: A Meta-Analysis of the Total Bone Volume. *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 2010 Jan 17.

Lambert, F., Leonard, A., Drion, P., Sourice, S., Layrolle, P. & Rompen, E. (2011) Influence of space-filling materials in subantral bone augmentation: blood clot vs. autogenous bone chips vs. bovine hydroxyapatite. *Clinical Oral Implants Research* 22: 538-545.

Lundgren, S., Andersson, S., Gualini, F. & Sennerby, L. (2004) Bone reformation with sinus membrane elevation: a new surgical technique for maxillary sinus floor augmentation. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 6: 165-173.

Nannmark, U. & Sennerby, L. (2008) The bone tissue responses to prehydrated and collagenated cortico-cancellous porcine bone grafts: a study in rabbit maxillary defects. *Clinical Implant Dentistry & Related Research* 10: 264–270.

Nosaka, Y., Nosaka, H. & Arai, Y. (2015) Complications of postoperative swelling of the maxillary sinus membrane after sinus floor augmentation. *Journal of Oral Science & Rehabilitation* 1: 26 – 33.

Nolan, P.J., Freeman, K. & Kraut, R.A. (2014) Correlation between Schneiderian membrane perforation and sinus lift graft outcome: a retrospective evaluation of 359 augmented sinus. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 72: 47-52.

Palma, V.C., Magro-Filho, O., de Oliveria, J.A., Lundgren, S., Salata, L.A. & Sennerby, L. (2006) Bone reformation and implant integration following maxillary sinus membrane elevation: an experimental study in primates. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 8: 11-24.

Pikos, M.A. (1999) Maxillary sinus membrane repair: Report of a technique for large perforations. *Implant Dentistry* 8: 29-34.

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 Sep;35 (8 Suppl):216-40.

Proussaefs, P., Lozada, J. & Kim, J. (2003) Effects of sealing the perforated sinus membrane with a resorbable collagen membrane: a pilot study in humans. *Journal of Oral Implantology* 29: 235-241.

Rombouts, C., Jeanneau, C., Camilleri, J., Laurent, P. & About, I. (2016) Characterization and angiogenic potential of xenogeneic bone grafting materials: Role of periodontal ligament cells. *Dental Material Journal* 35: 900–907.

Scala, A., Botticelli, D., Faeda, R.S., Garcia Rangel, I. Jr, Américo de Oliveira, J. & Lang, N.P. (2012) 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. *Clinical Oral Implants Research* 23: 175-181.

Scala, A., Botticelli, D., Rangel, I.G. Jr, de Oliveira, J.A., Okamoto, R. & Lang, N.P. (2010) Early healing after elevation of the maxillary sinus floor applying a lateral access: a histological study in monkeys. *Clinical Oral Implants Research* 21: 1320-1326.

Scala, A., Lang, N.P., de Carvalho Cardoso, L., Pantani, F., Schweikert, M. & Botticelli, D. (2015) Sequential healing of the elevated sinus floor after applying autologous bone grafting: an experimental study in minipigs. *Clinical Oral Implants Research* 26: 419–425.

Scala, A., Lang, N.P., Velez, J.U., Favero, R., Bengazi, F. & Botticelli, D. (2016) 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. *Clinical Oral Implants Research* 27: 1454–1461

Schweikert, M., Botticelli, D., De Oliveira, J.A., Scala, A., Salata, L.A. & Lang, N.P. (2012) Use of a titanium device in lateral sinus floor elevation: an experimental study in monkeys. *Clinical Oral Implant Research* 23: 100–105.

Schroeder, H.E. & Münzel-Pedrazzoli, S. (1973) Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue. Morphometric model, tissue sampling and test of stereologic procedures. *Journal of Microscopy* 99: 301–329.

Srouji, s., Ben-David, D., Funari, A., Riminucci, M. & Bianco, P. (2013). Evaluation of the osteoconductive potential of bone substitutes embedded with Schneiderian membrane – or maxillary bone marrow-derived osteoprogenitor cells. *Clinical Oral Implants Research* 24:1288-1294.

Srouji, s., Ben-David, D., Lotan, R., Riminucci, M., Livne, E. & Bianco, P. (2010). The innate osteogenic potential of the maxillary sinus (Schneiderian) membrane: an ectopic tissue transplant model simulating sinus lifting. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 39:793-801.

Srouji, s., Kizhner, T., Ben-David, D., Riminucci, M., Bianco, P. & Livne, E. (2009). The Schneiderian membrane contains osteoprogenitor cells: in vivo and in vitro study. *Calcified Tissue International* 84: 138- 45.

Stavropoulos, A., Kostopoulos, L., Mardas, N., Nyengaard, J.R. & Karring, T. (2001) Deproteinized bovine bone used as an adjunct to guided bone augmentation: an experimental study in the rat. *Clinical Implant Dentistry & Related Research* 3: 156–165.

Tadjoedin, E.S., de Lange, G.L., Bronckers, A.L., Lyaruu, D.M. & Burger, E.H. (2003) Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *Journal of Clinical Periodontology* 30: 261-270.

Tatum, H. Jr. (1977) Lectures presented at the Alabama Implant Study Group; cited in Smiler, D.G., Johnson, P.W., Lozada, J.L., Misch, C., Rosenlicht, J.L., Tatum, O.H. Jr. & Wagner J.R. (1992) Sinus lift grafts and endosseous implants. Treatment of the atrophic posterior maxilla. *Dental clinics of North America* 36: 151-186

Tatum, H. Jr. (1986) Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dental clinics of North America* 30: 207-229.

Testori, T., Wallace, S. S., Del Fabbro, M., Taschieri, S., Trisi, P., Capelli, M. & Weinstein, R.L. (2008) Repair of large sinus membrane perforations using stabilized collagen barrier membranes: surgical techniques with histologic and radiographic evidence of success. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 28: 9-17.

Xu, H., Shimizu, Y., Asai, S. & Ooya, K. (2004) Grafting of deproteinized bone particles inhibits bone resorption after maxillary sinus floor elevation. *Clinical Oral Implants Research* 15: 126-133.