

**Escola de Ciências  
da Saúde**



**UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA MICROARQUITETURA ÓSSEA DO CERABONE  
ALTERADO PELA FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE EM  
SEIOS MAXILARES. UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM  
COELHOS**

**DISSERTAÇÃO**

**ALINE WAGNER CARRASCO**

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

AVALIAÇÃO DA MICROARQUITETURA ÓSSEA DO CERABONE  
ALTERADO PELA FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE EM  
SEIOS MAXILARES. UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM  
COELHOS

ALINE WAGNER CARRASCO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Periodontia).

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo dos Santos Pereira

2021

AVALIAÇÃO DA MICROARQUITETURA ÓSSEA DO CERABONE  
ALTERADO PELA FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE EM  
SEIOS MAXILARES. UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM  
COELHOS

ALINE WAGNER CARRASCO

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia, da  
Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO),  
como parte dos requisitos para a obtenção  
do grau de Mestre em Odontologia (Área de  
Concentração: Periodontia).

Aprovada em      de                                      de 2021

Banca examinadora

---

Prof. Dr. ...– Orientador Universidade do Grande Rio

---

Prof. Dr. ... Universidade do Grande Rio

---

Prof. Dr. ... Universidade do Grande Rio

## DEDICATÓRIAS

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço esta conquista, em especial, à minha família que sempre esteve presente, mesmo à distância, até que esse momento chegasse.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Pereira dos Santos, pela dedicação e paciência

Agradeço aos professores da graduação da UNIGRANRIO pelos momentos de conhecimento compartilhados.

Agradeço aos meus colegas do mestrado, por toda força e união.

Agradeço à minha amiga Ednéa Leme pelo apoio, ajuda e carinho prestado.



## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....	12
2. JUSTIFICATIVA .....	20
3. OBJETIVOS.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
5.RESULTADOS.....	33
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO.....	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
9. ANEXOS .....	

## RESUMO

**Objetivo:** este estudo teve como objetivo avaliar o processo de formação óssea e a microarquitetura óssea através de uma análise comparativa da entre o biomaterial cerabone na forma pura e após processo de sonicação química em seios de coelho. **Material e método:** um total de 10 animais foram realizados acessos `as cavidades sinusais bilaterais onde aproximadamente 0,33 g do biomaterial foi enxertado. Os animais sofreram eutanásia após 42 dias da cirurgia. Para análise imunohistoquímica foram utilizadas imunomarcações com anticorpos policlonais. Para avaliação da microarquitetura óssea os parâmetros de volume ósseo (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), separação trabecular (Tb. S) e número de trabéculas (Tb.N) foram usados. O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para determinar o teste adequado e para análise estatística do estudo foi usado Teste t Student. **Resultados:** o volume ósseo (BV/TV) no Grupo 1 foi de 50,935%, enquanto no Grupo 2 foi de 52% ( $p=0,4623$ ). A espessura do trabeculado (Tb,Th) no Grupo 1 foi de 0,2118 mm e no Grupo 2 foi de 0,2114 ( $p=0,980$ ). A separação trabecular (Tb. S) foi de 0,2484 mm no Grupo 1 e no Grupo 2 foi 0,2451mm ( $p=0,650$ ). O número de trabéculas (Tb.N) no grupo 1 foi de 2,4075 1/mm e no Grupo 2 foi de 2,475 1/mm ( $p=0,800$ ), conforme a tabela abaixo. E score 3 para presença de Osteocalcina. **Conclusão:** Não houve significância estatística para os grupos avaliados ( $p \leq 0,05$ ).

**Palavras-chave:** biomaterial; coelhos; sonicação química.

## **ABSTRACT**

**Aim:** This study aimed to evaluate the bone formation process and bone microarchitecture through a comparative analysis of the biomaterial cerabone in pure form and after chemical sonication process in rabbit maxillary sinus. **Materials and Methods:** total of 10 animals, accesses were made to the bilateral sinus cavities where approximately 0.33 g of the biomaterial was grafted. The animals were euthanized 42 days after surgery. For immunohistochemical analysis, immunostaining with polyclonal antibodies was used. To assess bone microarchitecture the parameters of bone volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular separation (Tb.S) and number of trabeculae (Tb.N) were used. The Shapiro-Wilk test was performed to determine the appropriate test, and Student's t test was used for statistical analysis of the study. **Results:** the bone volume (BV/TV) in Group 1 was 50.935%, while in Group 2 it was 52% ( $p=0.4623$ ). The thickness of the trabeculae (Tb,Th) in Group 1 was 0.2118 mm and in Group 2 it was 0.2114 ( $p=0.980$ ). Trabecular separation (Tb.S) was 0.2484 mm in Group 1 and in Group 2 it was 0.2451 mm ( $p=0.650$ ). The number of trabeculae (Tb.N) in group 1 was 2.4075 1/mm and in group 2 it was 2.475 1/mm ( $p=0.800$ ), as shown in the table below. And score 3 for the presence of Osteocalcin. **Conclusion:** There was no statistical significance for the groups evaluated ( $p \leq 0.05$ ).

**Keywords:** biomaterial; chemical sonication; rabbits.



## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1. Processo de sonicação do Cerabone
- Figura 2. Processo de cavitação
- Figura 3. Colapso da bolha de cavitação
- Figuras 4. (A – H) Procedimento cirúrgico para elevação do seio maxilar
- Figura 5. Posicionamento do crânio no micro CT
- Figura 6 Imagem da microtomografia
- Figura 7 (A-C) Reconstrução das imagens

## **LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1 Indicações para elevação de seio maxilar
- Tabela 2 Distribuição dos grupos de estudo
- Tabela 3 Média dos resultados da Micro-CT para os grupos avaliados

## LISTA DE ABREVIações

A	Ampère
BS	Superfície óssea
BV	Volume ósseo
°C	Graus Celsius
Cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
deg	graus
EEB	Encefalopatia espongiforme bovina
g	gramas
kg	quilograma
kHz	kilohertz
kV	kilovolt
mCT	Micro tomografia
mg	miligrama
ml	mililitros
mm	milímetros
OC	osteocalcina
rpm	Rotações por minuto
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação trabecular
Tb.Th	Média da espessura trabecular
bTCP	Beta tri-fosfato de cálcio
UV	Ultravioleta
W	Watt

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A perda dentária está associada a uma saúde bucal pobre, sendo capaz de causar impactos fisiológicos, sociais e psicológicos (GUNILLA *et al*, 2013). Fisiologicamente, ocorre uma reabsorção do osso alveolar, principalmente após as perdas dentárias, sobretudo na região posterior da maxila, onde há a diminuição da altura compreendida entre o assoalho maxilar e a crista alveolar (Mattia *et al*, 2018, FARINA *et al*, 2011, BASSIR *et al*, 2018). Esse processo é denominado pneumatização do seio maxilar e limita reabilitação oral através de implantes dentários nesta região (CAVALCANTI *et al*, 2018), o que pode exigir a elevação do assoalho do seio maxilar (POLAK & SHAPIRA, 2013)

Um desafio na clínica odontológica é o controle da reabsorção óssea, que requer o desenvolvimento de novas pesquisas visando a melhoria das técnicas, o conhecimento e aprimoramento dos materiais utilizados como substitutos ósseos (MATTIA *et al*, 2013; CAVALCANTI *et al* 2018).

Para a reabilitação oral através da terapia com implantes é necessário que haja volume ósseo suficiente além da atividade deste no rebordo remanescente (MATTIA *et al*, 2013; RICKERT *et al*, 2012). Portanto, quando se pretende um aumento ósseo vertical prévio pode haver necessidade da utilização de diferentes técnicas e substitutos ósseos. (SANDZ-SANCHES *et al*, 2015).

CHAVANAZ (1994), em análise estatística de 15 anos de experiência cirúrgica demonstrou as diferentes técnicas que têm sido utilizadas rotineiramente para a elevação do seio maxilar e colocação de enxertos. TATUM

(1975) foi o responsável pela descrição da primeira técnica de elevação maxilar. Posteriormente, Boyne e James (1980) propuseram uma segunda técnica, utilizando-se de osso autógeno e instalação de implante em lâmina seis meses após o enxerto.

Dentre as técnicas existentes para a correção da pneumatização e defeitos ósseos maxilares posteriores, a técnica de elevação do seio maxilar é considerada uma técnica favorável, segura e com alta previsibilidade de sucesso, por permitir a formação de tecido ósseo com qualidade e quantidade capaz de possibilitar a instalação de implantes (PANG *et al*, 2019; TAWIL *et al*, 2018; STERN & GREEN, 2012; SILVA *et al* 2016)

As técnicas de elevação do seio maxilar consistem na elevação da mucosa deste seio, mucosa essa denominada Membrana de Schneider, e entre esta e o assoalho maxilar a deposição de materiais de enxertia óssea (BOYNE & JAMES, 1980). Pretende-se com elas recriar o volume ósseo viável necessário nos seios maxilares pneumatizados para posterior instalação de implantes (CHAVANAZ, 1994). No entanto, há na literatura uma diversidade de trabalhos apontando a melhor correlação entre a técnica de elevação e a indicação clínica. (Tabela 1).

**Tabela 1.** Adaptado de Stern & Green, 2012

Table 1 Indications for sinus lift surgery	
Condition	Treatment
Edentulous maxilla with severely atrophic maxilla and pneumatized sinus	Open sinus lift via lateral maxilla sinus antrostomy; delayed implant placement
Edentulous maxilla with some remaining alveolar bone (0–4 mm)	Open sinus lift via lateral maxilla sinus antrostomy; delayed implant placement
Edentulous maxilla with some remaining alveolar bone (5–10 mm)	Open sinus lift via lateral maxilla sinus antrostomy; immediate implant placement
Single-tooth edentulous space with 5–7 mm alveolar bone remaining	Open sinus lift via lateral maxilla sinus antrostomy; immediate implant placement
Single-tooth edentulous space with >8 mm bone remaining	Open sinus lift via lateral maxilla sinus antrostomy or closed (crestal approach) osteotome technique; immediate implant placement

Assim como para a técnica de elevação, há uma variedade de enxertos ósseos disponíveis para o uso clínico. Em geral esses enxertos são classificados baseados em sua origem: autógeno (próprio paciente), alógeno (mesma espécie), xenógeno (espécie diferente) e aloplástico (materiais inorgânicos, sintéticos, polímeros e vidro bioativo) (BROWAEYS *et al*, 2007; BHALLA & DYM, 2020; MOUSSA & DYM, 2020).

O enxerto ósseo de origem autógena é considerado o biomaterial padrão ouro (MOUSSA & DYM, 2020; FILLINGHAM & JACOBS, 2016) quando há a necessidade de restauração da arquitetura óssea devido a preservação das células e proteínas osteogênicas, apresentando além de sua característica osteogênica, a capacidade osteoindutora e osteocondutora (MIRON *et al*, 2013; WATANABE *et al*, 1999; TONG *et al*, 1998; LUCKHOM & ZARB, 1986), porém, por precisarem de um segundo sítio cirúrgico, aumentam a morbidade do paciente, dor ou desconforto e outras complicações relacionadas ao aumento do tempo cirúrgico (RAGHOEBAR *et al*; 2007, DEVELIOGLU *et al*, 2009).

Outros tipos de enxertos utilizados são os aloplásticos como as biocerâmicas que possuem atividade osteocondutora, lenta reabsorção e baixas resistência mecânica, usadas principalmente para preenchimento de cavidades (JORDANA *et al*, 2017).

Ainda dentre os tipos de enxertos temos os xenoenxertos, que são os mais comumente usados dada a sua origem natural e à alta disponibilidades do tecido doador e baixo custo (PERIĆ KAČAREVIĆ *et al*, 2018). Esse tipo de enxerto é relatado como osteocondutor, e nenhuma resposta inflamatória foi observada com o uso deste biomaterial, podendo ser usado com sucesso como substituto ósseo (PIATELLI *et al*, 1999).

Os xenoenxertos são derivados de osso bovino desproteinizado mineralizado, e tem como vantagem, ser derivado tanto de osso esponjoso quanto do osso cortical. Sua arquitetura e estrutura geométrica se assemelha ao osso e sua reabsorção é lenta, o que pode ser uma vantagem clínica na preservação do volume ósseo aumentado. Por estas características o xenoenxerto, derivado de osso bovino parece ser altamente biocompatível e osteocondutor (TAWIL *et al* 2018; JORDANA *et al* 2017; BROAWAEYS *et al*, 2007). Mostra-se de reabsorção lenta, não apresenta resposta inflamatória quando utilizado em humanos. Daí o sucesso na utilização deste biomaterial como um substituto ósseo em procedimentos de aumento do seio maxilar (PIATTELLI *et al*, 1999)

A neoformação óssea dos enxertos consiste em três mecanismos básicos: osteogênese, osteoindução e osteocondução. A osteogênese inicia-se quando as células vivas do enxerto são transplantadas ao leito receptor, dando

origem ao osteóide, esse processo irá depender da quantidade de células viáveis presente no enxerto no momento da transferência para o leito receptor, determinando a quantidade de neoformação óssea na região. A neoformação óssea se dá a partir da diferenciação celular, no qual os fibroblastos são diferenciados em odontoblastos, processo esse denominado osteoindução. Após a osteogênese e osteoindução, a terceira fase da neo formação óssea é a osteocondução. Nessa fase a formação óssea se dá por conta do crescimento no número de capilares e células progenitoras que podem estar circundadas e entremeadas dentro e fora do enxerto remanescente recém enxertado, esse processo irá aumentar a neo formação óssea, sendo que nessa fase o processo inicia-se mesmo em momentos antes onde uma nova estrutura óssea já foi formada (PINTO, 2007).

O processo final de mineralização, caracteriza a etapa final de reparação óssea e é resultado da deposição de cálcio na matriz de tecido ósseo, composto principalmente por colágeno. A osteocalcina (OC) é uma proteína não-colágena sintetizada por osteoblastos durante o processo de deposição de cálcio e, é considerada uma proteína importante no processo de maturação óssea (LUVIZOTO & DIAS, 2010). Essa proteína é um marcador sensível e específico da formação óssea (MERLE & DELMAS, 1990).

Estudos recentes tratam do desenvolvimento de técnicas que propiciem a melhora das propriedades destes biomateriais, visando aprimorar a funcionalização de suas superfícies com moléculas bioativas que atuam diretamente nas células do tecido ósseo desencadeando respostas favoráveis ao processo de reparo tecidual (LISBOA-FILHO *et al*, 2018). Para tanto foi demonstrado a viabilidade da utilização do processo de sonicação através do

ultrassom, na qual é possível promover a síntese de materiais nanoestruturados, homogeneizando duas ou mais substâncias, por meio de ondas ultra-sônicas, promovendo modificações químicas e físicas (BANG & SUSLICK,2010; ARRUDA *et al*, 2013; MASON *et al*,2011; ROUMIANI & DOROSTI, 2018).

A técnica da sonicação consiste na conversão de voltagem elétrica em ondas sonoras, por meio de um aparelho ultrassom. Estas ondas sonoras causam vibrações mecânicas que são transferidas para o meio líquido formando bolhas/microbolhas, que entram em colapso, processo este denominado de cavitação acústica (PARVEEN *et al*, 2013). Este método é economicamente viável e eficiente na redução e homogeneização de partículas devido a sua capacidade de fornecer alta temperatura e pressão em curto espaço de tempo, induzindo a rápida alteração morfológica (GOMES-FERREIRA *et al*, 2018). Os efeitos aparecem após os fenômenos de captação acústica, ou seja, a formação e colapso implosivo de bolhas em líquido da ordem de microssegundos (ARRUDA *et al* 2013). A oscilação rápida desta ponteira produz um campo de alta energia no fluido. No solvente dentro desse campo acontece um processo de ebulição e colapso de bolhas (HILDING *et al*, 2003). As vibrações dessa ponteira, em associação ao colapso das bolhas, são capazes de provocar a incorporação de substâncias bioativas a materiais. Quando o ultrassom é aplicado a um sistema sólido-líquido, devido à proximidade da superfície sólida, o colapso entre as bolhas ocorre de forma assimétrica, há uma entrada de fluido da bolha para a superfície sólida, a este fenômeno dá-se o nome de microstreaming (microjatos), ou seja, há uma penetração das bolhas formadas na matriz sólida (BHASKARACHARYA *et al*, 2009)

No intuito de acompanhar o desenvolvimento morfológico da estrutura óssea pós enxertos, vem se utilizando diferentes técnicas, como a análise histológica e as técnicas de imagem em alta resolução. Embora análises histológicas forneçam informações importantes, existem limitações no que se refere à microarquitetura óssea (BOUXEIN *et al*, 2010). Por outro lado, a técnica de micro tomografia (micro-CT) permite uma avaliação mais precisa da morfologia das trabéculas e corticais ósseas em animais e humanos e é tida como “padrão ouro da densidade óssea” (KIM & HENKIN, 2013). Os dados do micro CT podem ser usados para calcular parâmetros histomorfométricos incluindo superfície óssea (BS), volume ósseo (BV), espessura trabecular média (Tb.Th), separação trabecular (Tb.Sp) e número trabecular (Tb.N). Esses parâmetros que descrevem a microarquitetura do osso têm se mostrado importante, pois tem sido repetidamente mostrado pela literatura que quantidade e qualidade ósseas fornecem uma estimativa das propriedades físicas e mecânicas do osso (CHOPRA *et al*, 2009).

Atualmente, a literatura ainda deixa lapsos a respeito do processo de aperfeiçoamento das técnicas de enxertia óssea, no que tange à escolha do material, nas formas de prepara-lo, e mesmo no segmento para avaliar o sucesso do processo, embora muitos estudos vem sendo desenvolvidos (citar alguns). Nesse contexto, este estudo se constitui em analisarmos o xenoenxerto Cerabone. um biomaterial com características semelhantes ao osso autógeno.

Cerabone é um biomaterial derivado de osso bovino, e exibe uma semelhança muito próxima ao osso humano devido à sua porosidade e composição química (PERIĆ KAČAREVIĆ *et al*, 2018). No processo de purificação do cerabone, o tecido ósseo é sinterizado em alta temperatura

(>1200 °C) para remover todos os compostos orgânicos e também matar príons, bactérias e vírus, mantendo a parte inorgânica do osso (hidroxiapatita altamente cristalina) (TADIC & EPPLE, 2004). Outro dado importante é a seleção dos animais doadores, que está fortemente relacionado à segurança do material. O Cerabone é removido de bovino vindos de matadouros registrados na Austrália e Nova Zelândia, ambos os países são classificados por apresentarem um risco insignificante de Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) de acordo com Organização para a Saúde Animal (WENZ et al, 2001).

## **JUSTIFICATIVA**

Diante do exposto, observa-se a importância de se investigar a funcionalização do substituto ósseo Cerabone (Botiss Biomaterials, Berlim, Alemanha), disponível no mercado e como este reage ao processo de funcionalização mediante a utilização da técnica de sonicação química no reparo ósseo em seios maxilares de coelhos.

## **2. OBJETIVOS**

### **1. Objetivos geral**

O objetivo deste estudo é fazer uma análise comparativa entre o substituto ósseo Cerabone® (Botiss Biomaterials, Berlim, Alemanha), na forma pura e o Cerabone com alteração microestrutural pelo processo de sonicação química, no reparo ósseo em seios maxilares de coelhos.

### **2. Objetivos específicos**

- Analisar por micro tomografia computadorizada a superfície do biomaterial em seios de coelhos
- Avaliar o índice de calcificação através da imunomarcação para osteocalcina, proteína que representa a calcificação óssea.
- Discutir os resultados apresentados em comparação com a literatura

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Modelo experimental:

Para a presente pesquisa, foram utilizados 10 coelhos machos (Linhagem Botucatu) com peso corporal de 3 a 4 kg provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus Botucatu. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, protocolo FOA nº 00350-2019. Os animais serão acondicionados durante o período pré e pós-operatório até a sua eutanásia, em gaiolas individuais, com ração sólida padrão (Ração Procoelho, Primor®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) e água “ad Libitum”, mantidos sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) no biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. A definição do número de animais a serem estudados em cada grupo foi determinado pelo power test realizado no website <http://www.lee.dante.br> com base em trabalhos anteriores (CANEVA *et al*, 2016). A diferença na média detectada foi de 17.9, com desvio padrão de 10.1, o nível de significância adotado foi de 5%, o poder do teste foi atribuído à 80% e conduzido na forma monocaudal. Esta pesquisa foi realizada de acordo com as diretrizes ARRIVE para pesquisas em animais, propostas por KILKENNY *et al* (2010). Dessa forma, os animais a serem estudados serão aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais, de acordo com o material de enxerto:

**Tabela 2 – Distribuição dos grupos de estudo**

<b>Identificação do grupo</b>	<b>n</b>	<b>Material de enxertia</b>
Grupo 1	10	Biomaterial Cerabone (grupo controle)
Grupo 2	10	Biomaterial Cerabone sonicado (Grupo teste)

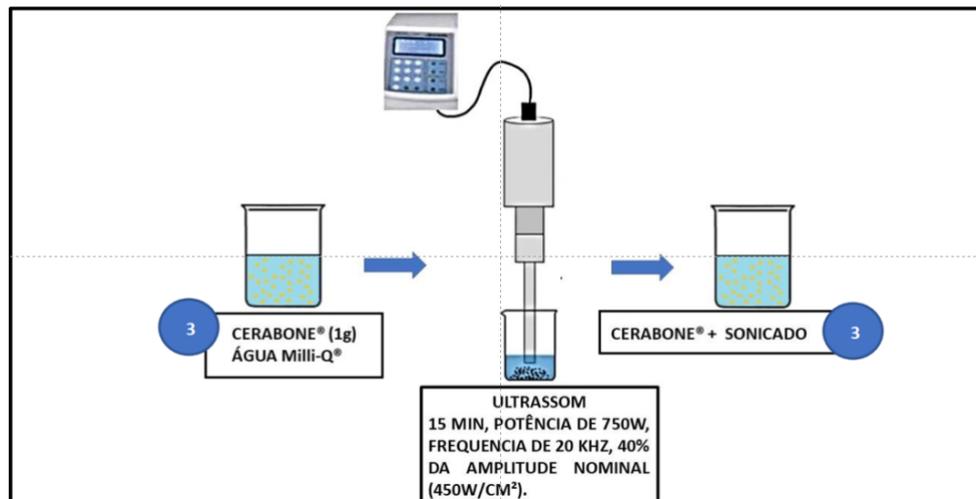
### **3.2 Preparação e caracterização do biomaterial:**

#### **3.2.1 – Preparação: Grupo 2 (Cerabone® Sonicado)**

O protocolo empregado para a preparação e caracterização dos Biomateriais foi estabelecido por Gomes-Ferreira & Lisboa-Filho (Kilkenny *et al*, 2010) a ser realizado no Laboratório de Materiais Avançados do Departamento de Física da Faculdade de Ciências da UNESP-Bauru (Responsável: professor Paulo Noronha Lisboa-Filho).

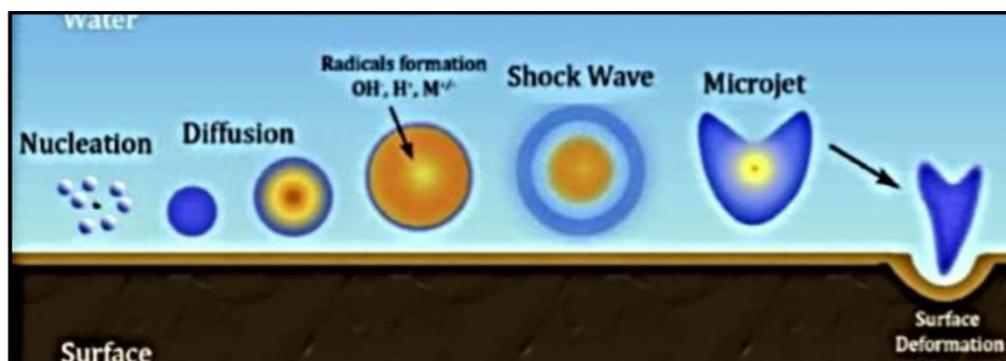
Para preparação do biomaterial, o Cerabone® puro passou pelo processo de sonificação. A sonicação foi realizada utilizando-se o aparelho Sonics® VCX-750 (Sonics & Materials, Inc., EUA), por cerca de 15 minutos (KILKENNY *et al*, 2010). Os parâmetros de sonicação adotados são: potência de 750 W; frequência de 20 kHz; e 40% da amplitude nominal do equipamento (450W / cm<sup>2</sup>). Para se obter um sistema homogêneo e ter o tamanho das partículas reduzidos será utilizada a água ultra-pura Milli-Q® (Millipore, EUA). A água Milli-Q® ultrapura faz com que as bolhas de cavitação tenham maior vapor de soluto e, assim, acelere o efeito da cavitação acústica.

**Figura 1** - Sonicação do Cerabone (Grupo 2).

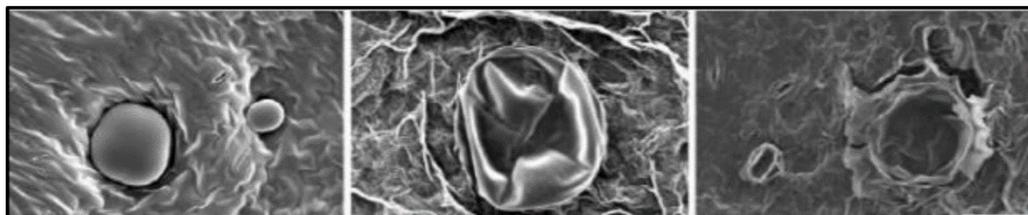


Foi utilizado durante este processo, um Ultrassom de ponteira que oscila a uma frequência fixa e potencial variável. (Figuras 2 e 3). A água ultra-pura Milli-Q® utilizada nesse experimento funciona como um solvente para os solutos (Cerabone® puro). Assim, o Cerabone® após o processo de sonificação, apresenta modificação em sua estrutura dado este processo de cavitação ou colapso das bolhas formadas contra a sua superfície.

**Figura 2** - Processo de cavitação. Adaptado de Pokhrel, Vabbina, Pala, 2016



**Figura 3** - Colapso da bolha de cavitação. Adaptado de Chemat et al, 2011.



Uma vez realizado este processamento, as amostras foram deixadas para secar a 60 °C por um período de 8 horas e, posteriormente, foi realizado um processo de esterilização por meio de ultravioleta (UV).

### **3.2.2 Caracterização do biomaterial**

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Materiais Avançados do Departamento de Física da Faculdade de Ciências da UNESP-Bauru (Responsável: professor Paulo Noronha Lisboa-Filho), mesmo laboratório onde foi realizada a fase de preparação relacionada à sonicação.

### **3.2.3 Procedimentos cirúrgicos:**

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Inicialmente, os 10 animais foram mantidos em jejum pré-operatório de 8 horas. A anestesia geral foi realizada por administração via intramuscular, utilizando Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil), na dosagem de 10mg/Kg, e Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5mg/Kg.

Foi realizada a tricotomia e antissepsia pré-operatória no dorso nasal (Figura A) através da fricção de gaze embebida em Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica,

São José do Rio Preto) associado ao Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto), e aposição de campos estéreis. O protocolo cirúrgico empregado para a realização do acesso a cavidade sinusal foi o estabelecido por Asai, Shimizu & Ooya (2002). Para tanto foi utilizada uma lâmina de bisturi número 15C (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão), montada em cabo de bisturi número 3 (Hu-Friedy®, German), para realizar uma incisão linear de 50mm na linha mediana do dorso nasal do animal (Figura B). A pele e o perióstio foram cuidadosamente descolados com um descolador tipo Molt número 9 (Hu-Friedy®, German) para fornecer a exposição do osso nasal e sutura nasoincisa (Figura C). Posteriormente à exposição, uma janela circular com diâmetro de 5 mm foi realizada bilateralmente a linha mediana do dorso nasal, aproximadamente a 20 mm anterior a sutura nasofrontal e a 10 mm lateralmente à linha média (Figura 01), por meio da utilização de uma broca trefina de 3 mm de diâmetro utilizada para a demarcação da área (Figura D) e uma broca diamantada esférica nº 1011 (KG Sorensen®, Cotia, São Paulo, Brasil) para a finalização das osteotomias (Figura E), ambas montadas em contra-ângulo redutor de 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinville, Brasil), conectado a um motor elétrico rotação controlada (modelo BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1500 rpm. Durante o procedimento foi realizado irrigação com solução salina fisiológica estéril a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil). Uma vez realizada a confecção da janela no seio maxilar, a membrana sinusal foi descolada e elevada (Figura F) com o uso de curetas especiais (Neodent®, Curitiba, Paraná, Brasil) para garantir que sua integridade física seja mantida. Uma vez feita a preparação dos leitos cirúrgicos, os enxertos foram, então, acondicionados de acordo com a

distribuição dos grupos (G1 e G2). Uma quantidade de 0,33g foi colocado em cada seio maxilar por procedimento experimental (Franceschi *et al*, 2013).

O reposicionamento da musculatura e do periósteo foi realizada com fio Poliglactina 910 5-0 (Vicryl 5-0®, Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil) através de pontos interrompidos simples, e para a pele foi utilizado fio de nylon 5-0 (Ethilon 5-0, Ethicon Johnson&Johnson), onde também foi realizado sutura por meio de pontos interrompidos simples (Figura H).

**FIGURAS 4. (A – H).** Procedimento cirúrgico para elevação do seio maxilar. Adaptado Duailibe de Deus, CB & Garcia Júnior, IR.



Fig. A – Tricotomia e antissepsia

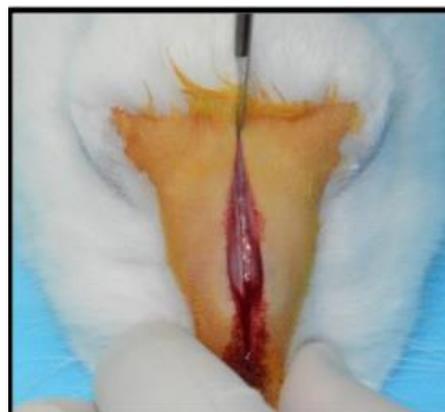


Fig. B - Incisão



Fig. C – Deslocamento periosteal



Fig D – Demarcação da janela



Fig E – Desgaste



Fig F – Descol. da membr. do seio



Fig G – Deposição do biomaterial

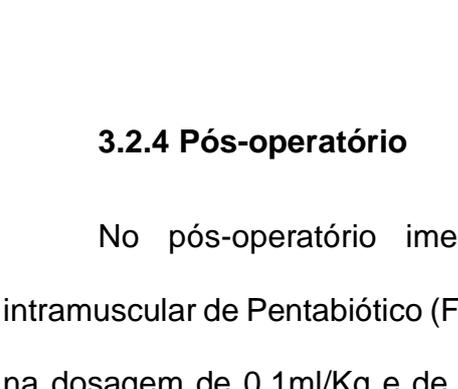
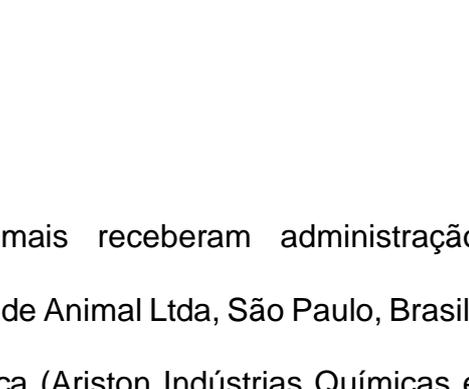


Fig H – Sutura



### 3.2.4 Pós-operatório

No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (Fort Dodge Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil) na dosagem de 0,1ml/Kg e de Dipirona Sódica (Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil) na dosagem de 1mg/Kg/dia, sendo a primeira dose no pós-operatório imediato e as demais nos 2 dias consecutivos. Os animais foram mantidos em gaiolas com alimentos e água ad libitum até a eutanásia.

### **3.2.5 Eutanásia dos animais e coleta dos espécimes**

A eutanásia dos animais foi efetuada após 42 dias da realização do procedimento cirúrgico, através da aplicação do protocolo de sedação e anestesia com Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil), na dosagem de 10mg/Kg, e Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5mg/Kg, seguida da perfusão intracardíaca de soro fisiológico a 0,9% e formaldeído 4% com bomba perfusora peristáltica. Constatada a morte dos animais, todo complexo nasal contendo os materiais enxertados foi removido com brocas carbide e motor elétrico com abundante irrigação com soro fisiológico 0,9% (MERZ, 1968). Após a eutanásia dos espécimes, as amostras foram armazenadas em solução de formalina a 10% (pH=7,0) lavadas em água corrente por 24 horas e acondicionadas em formaldeído a 10% para fixação celular por 48 horas.

### **3.3 Análise imunoistoquímica**

Para este tempo experimental foram propostas imunomarcações para OC (Osteocalcina), que é uma proteína associada à calcificação do osso e sua expressão indica maturação deste (HUGHES et al, 1995, STREET et al, 2002). Para o processamento imunoistoquímico foram utilizados anticorpos primários policlonais produzidos em cabras OC (Goat anti-OC, SantaCruz Biotechnology, SC18319).

O padrão da distribuição da imunocoloração foi analisado qualitativamente como relatado por DOS SANTOS PEREIRA *et al.* (2017) por

um único observador, previamente calibrado, atribuindo-se os **scores 0** (sem marcação), **1** (marcação fraca/difusa), **2** (moderada) e **3** (intensa), a fim de avaliar a expressão das proteínas.

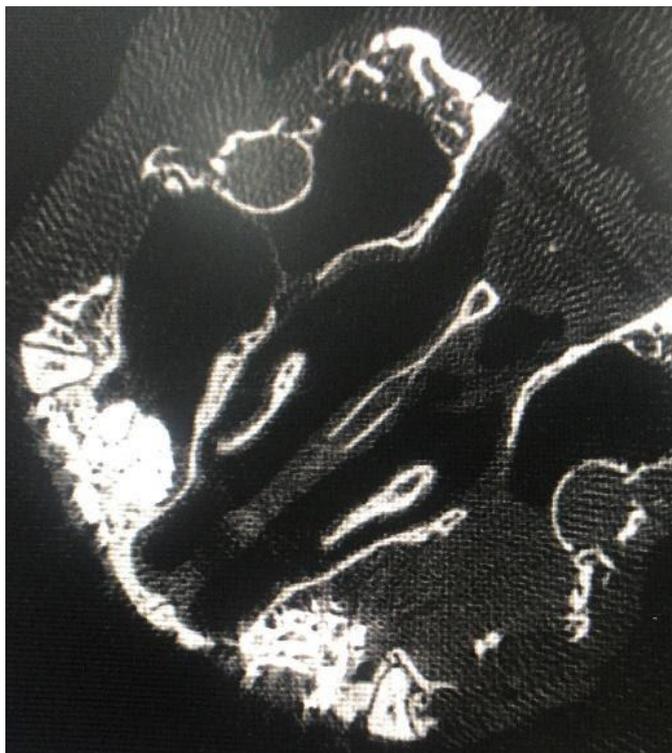
### 3.4 Análise da microtomografia

Antes do escaneamento, os espécimes foram acondicionados em álcool 70% por 24 horas. Os crânios dos coelhos foram escaneados na direção caudal-cranial no plano longitudinal usando o micro tomógrafo modelo SkyScan 1174 (Bruker, Kontich, Belgium) do laboratório de Biomateriais de Odontologia da Universidade Unigranrio. Os seguintes parâmetros foram utilizados para aquisição das amostras: corrente de 800 A, voltagem de 50 kV, tamanho do pixel da imagem 28,8um, passo de rotação de 1,00 deg com 180 ° em torno do longo eixo do crânio, filtro de alumínio 2,0mm e a média de quadro 2.

**Figura 5.** Posicionamento do crânio (caudal-cranial) no micro-CT



**Figura 6.** Imagem da microtomografia



Em seguida, as imagens foram reconstruídas utilizando o software NRecon (v1.6.9.8) (SkyScan – Kontich, Belgium) e foram analisadas no software CTAnalyzer (CTAn) (v1.12.4.0) (SkyScan – Kontich, Belgium). Com isso, foram definidos a fração de volume ósseo (BV/TV), a espessura trabecular (Tb.Th), o número de trabéculas (Tb. N) e a separação das trabéculas (Tb.Sp) conforme preconizado por Bouxsein *et al* (2010).

As imagens foram abertas, colocadas na posição axial, e 100 cortes das amostras foram selecionados usando a ferramenta região de interesse (ROI) na porção mais central da área enxertada e delimitada por mão livre com tamanho de 252mm 102 mm.

**Figuras 7 (A-C)** – Demarcação do enxerto ósseo no interior do seio maxilar no programa CTan

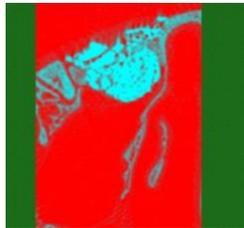


Figura A



Figura B

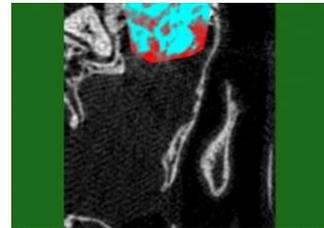


Figura C

### **3.5 Análise estatística dos resultados**

O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para determinar se as amostras possuíam distribuição normal e determinar o teste estatístico adequado. Para análise estatística do estudo foi usado o Teste t Student (GraphPad Prism 8, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). O nível de significância adotado foi  $p \leq 0.05$ .

#### 4. RESULTADOS

O volume ósseo (BV/TV) no Grupo 1 foi de 50,935%, enquanto no Grupo 2 foi de 52% ( $p=0,4623$ ). A espessura do trabeculado (Tb,Th) no Grupo 1 foi de 0,2118 mm e no Grupo 2 foi de 0,2114 ( $p= 0.980$ ). A separação trabecular (Tb.S) foi de 0,2484 mm no Grupo 1 e no Grupo 2 foi 0,2451mm ( $p=0,650$ ). O número de trabéculas (Tb.N) no grupo 1 foi de 2,4075 1/mm e no Grupo 2 foi de 2,475 1/mm ( $p= 0.800$ ), conforme a tabela abaixo. Não houve significância estatística para os grupos avaliados ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 3.** Média dos resultados da Micro-CT para os grupos avaliados

Grupo	BV/TV (%)	Tb.Th (mm)	Tb.Sp (mm)	Tb.N (1/mm)
Cerabone	50,935	0,2118	0,2484	2,4075
Cerabone Sonicado 52		0,2114	0,2451	2,475

A proteína osteocalcina, expressa na matriz óssea extracelular relacionada à calcificação óssea, apresentou coloração intensa da superfície óssea (*score* 3) e foi observada em todos os grupos.

## 5. DISCUSSÃO

Ressalta-se que a análise da microarquitetura óssea é umas das propriedades essenciais para a qualidade óssea (BURGHARDT et al; BAUER & LINK, 2009). Diante disso a micro-CT, com dados micro arquitetônicos tridimensionais se mostra um recurso de relevância para tal análise, quando comparada a histomorfometria, uma vez que esta última traz dados bidimensionais, e a micro-CT tridimensionais. Com base em estudos anteriores, nosso estudo teve como objetivo uma avaliação da microarquitetura comparando o biomaterial com a funcionalização deste.

KIM & HENKIN (2013) avaliaram a correlação entre densidade óssea e a microarquitetura óssea da maxila e mandíbula de cadáveres humanos através de micro-CT e constataram uma variação da densidade óssea de BV/TV de 2,4% a 48,2%. Sicca et al (2007), avaliaram a neoformação óssea em seios maxilares de coelho utilizando xenoenxerto (Gen-Tech). Em seus resultados foram encontrados uma média de 24,16% de densidade de volume ósseo após 8 semanas de reparo ósseo. Parâmetro como a fração de volume ósseo (BV/TV) é importante para determinar os resultados da microarquitetura trabecular. No presente estudo, foram encontrados uma média de 50,93% de fração de volume ósseo (BV/TV) para o Cerabone puro e 52% para o grupo teste com Cerabone após sonicação química depois de 42 dias de reparo ósseo, considerando resultados satisfatórios em ambos os grupos.

HUANG *et al* (2011) avaliaram as diferenças tridimensionais, através do micro CT, da densidade mineral óssea e da microarquitetura de enxertos ósseos autógenos e osso nativo adjacente aos enxertos, após elevação de seios maxilares. Diferenças significativas entre os dois tipos de osso foram observados

para alguns parâmetros: BS / BV, Tb.Pf, Tb.Th e Tb.Sp ( $P < 0,05$ ). BS / BV e Tb.Pf foram maiores para osso enxertado [0,56 (1 / pixel) e 0,20 (1 / pixel), respectivamente] do que para osso nativo [0,31 (1 / pixel) e 0,07 (1 / pixel), respectivamente]. O Tb.Th e o Tb.Sp foram 37,35% e 12,74% menores para o osso enxertado (7,85 pixels e 25,61 pixels) do que para osso nativo (12,53 pixels e 29,35 pixels). A morfologia da estrutura trabecular do osso enxertado é diferente do osso nativo, uma vez que as trabéculas do osso enxertado são finas e próximas umas das outras e um osso trabecular desconectado pode ocorrer, resultando em estruturas trabeculares altamente complexas.

PEREIRA *et al* (2020) compararam as mudanças volumétricas e a microarquitetura óssea em seios maxilares humanos aumentada com vidro bioativo (Biogran) sozinho, vidro bioativo combinado com enxerto ósseo autógeno (1: 1), ou enxerto ósseo autógeno sozinho. Doze seios maxilares foram enxertados com vidro bioativo (grupo 1), nove com vidro bioativo misturado com enxerto ósseo autógeno 1: 1 (grupo 2) e 12 com enxerto ósseo autógeno (grupo 3). A fração de volume ósseo (BV / TV) foi 52,06% no grupo 1, 57,04% no grupo 2, e 57,19% no grupo 3 ( $P > 0,05$ ). A espessura trabecular (Tb.Th) foi de 0,14 mm no grupo 1, 0,19 mm no grupo 2, e 0,38 mm no grupo 3 ( $P > 0,05$ ). Os números trabeculares (Tb.N) para os biomateriais avaliados foram 2,70 1 / mm, 2,86 1 / mm e 2,04 1 / mm para os grupos 1, 2 e 3, respectivamente. A separação trabecular (Tb. Sp) foi de 0,13 mm no grupo 1, 0,18 mm no grupo 2 e 0,38 mm no grupo 3. Os resultados da microarquitetura trabecular mostraram que os materiais usados nos grupos 1 e 2 tiveram resultados satisfatórios como substitutos ósseos.

CHOPRA *et al* (2009) fizeram uma análise em micro-CT da formação óssea após enxerto com beta trifosfato de cálcio (TCP) em levantamento de seios maxilares de humanos e avaliaram os parâmetros e resultados Tb.N (2,66), Tb.Th (0,23) e Tb.Sp (0,38). No presente estudo, tivemos como resultados separação trabecular (Tb. S) foi de 0,2484 mm no Grupo 1 e no Grupo 2 foi 0,2451mm (p=0,650). O número de trabéculas (Tb.N) no grupo 1 foi de 2,4075 1/mm e no Grupo 2 foi de 2,475 1/mm (p= 0.800).

KIM *et al* (2020) fizeram um estudo comparando a estabilidade volumétrica e a formação óssea em calvaria de coelhos após enxertos com osso autógeno e um xenoenxerto (Bio-Oss). As amostras tiveram análises clínicas e histológicas e, como resultado o xenoenxerto demonstrou uma manutenção de volume ósseo e nova formação óssea. Este estudo sugere que o xenoenxerto induz a formação óssea devido sua estabilidade e propriedade osteocondutora.

XU *et al*, 2004 mostraram que partículas ósseas desproteinizadas lentamente reabsorvidas contribuem para o aumento estável do assoalho do seio maxilar ao inibir a reabsorção óssea. XU *et al* (2003) em estudos realizados, compararam a capacidade osteocondutora de partículas ósseas desproteinizadas de dois tamanhos diferentes em seios maxilares de coelhos, e concluíram que partículas pequenas e a distância entre partículas mostra uma maior capacidade osteocondutora.

Na atualidade, existe um caminho de pesquisa através da funcionalização de biomateriais. No presente estudo, foi constatado que o Cerabone, após passar pelo processo de sonicação, apresenta uma modificação em sua estrutura, dado pelo processo de cavitação ou colapso das bolhas formadas

contra a sua superfície, e os resultados da microarquitetura óssea foram similares aos estudos prévios.

Para a avaliação do índice de calcificação, foi utilizado imunomarcção para osteocalcina, que é proteína expressa em osteoblastos totalmente diferenciados, sendo um marcador específico para a formação óssea (Shyng et al, 1999), sendo o resultado de *score* 3, o que mostra uma marcação intensa para osteocalcina.

## **6. CONCLUSÃO**

O processo de funcionalização do biomaterial não mostrou diferenças significativas quando comparado ao biomaterial puro. Mas os resultados da microarquitetura óssea foram satisfatórios quando comparado a outros biomateriais.

Outras avaliações devem ser realizadas para uma melhor caracterização do tecido ósseo formado. Esse estudo foi experimental e carece de mais dados para posterior teste em humanos, e estudos histomorfométricos futuros para avaliação celular e do padrão de formação óssea.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Arruda LB, Orlandi MO, Lisboa-Filho PN. Morphological modifications and surface amorphization in ZnO sonochemically treated nanoparticles. *Ultrason Sonochem.* 2013 May;20(3):799-804

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 Aug;13(4):405-9.

Bang JH, Suslick KS. Applications of ultrasound to the synthesis of nanostructured materials. *Adv Mater.* 2010 Mar 12;22(10):1039-59.

Bassir SH, Alhareky M, Wangsrimongkol B, Jia Y, Karimbux N. Systematic Review and Meta-Analysis of Hard Tissue Outcomes of Alveolar Ridge Preservation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2018 Sep/Oct;33(5):979-994.

Bauer JS, Link TM. Advances in osteoporosis imaging. *Eur J Radiol.* 2009 Sep;71(3):440-9. doi: 10.1016/j.ejrad.2008.04.064. Epub 2009 Aug 3. PMID: 19651482.

Bhalla N, Dym H. Update on Maxillary Sinus Augmentation. *Dent Clin North Am.* 2021 Jan;65(1):197-210. doi: 10.1016/j.cden.2020.09.013. Epub 2020 Nov 2. PMID: 33213709.

Bhaskaracharya, R.K., Kentish, S., Ashokkumar, M. Selected Applications Of Ultrasonics In Food Processing. *Food Engineering Reviews*, V.1, P. 31-49, 2009.

Block MS, Kent JN, Kallukaran FU, Thunthy K, Weinberg R. Bone maintenance 5 to 10 years after sinus grafting. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998 Jun;56(6):706-14; discussion 714-5.

Bouxsein ML, Boyd Sk Fau - Christiansen BA, Christiansen Ba Fau - Guldborg RE, Guldborg Re Fau - Jepsen KJ, Jepsen Kj Fau - Muller R, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010 Jul;25(7):1468-86.

Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg.* 1980 Aug;38(8):613-6.

Browaeys H, Bouvry P, De Bruyn H. A literature review on biomaterials in sinus augmentation procedures. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2007 Sep;9(3):166-77. PMID:

Caneva M, Lang NP, Garcia Rangel IJ, Ferreira S, Caneva M, De Santis E, et al. Sinus mucosa elevation using Bio-Oss((R)) or Gingistat((R)) collagen sponge: an experimental study in rabbits. *Clinical Oral Implants Research.* 2016; 28(7), e21–e30.

Cavalcanti MC, Guirado TE, Sapata VM, Costa C, Pannuti CM, Jung RE, César Neto JB. Maxillary sinus floor pneumatization and alveolar ridge resorption after tooth loss: a cross-sectional study. *Braz Oral Res.* 2018 Aug 6;32:e64. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2018.vol32.0064. PMID: 30088551.

Chanavaz M. Sinus grafting related to implantology. Statistical analysis of 15 years of surgical experience (1979-1994). *J Oral Implantol.* 1996;22(2):119-30. PMID: 9151634.

Chemat, F.; Huma, Z. E.; Khan, M. K. Applications Of Ultrasound In Food Technology: Processing, Preservation And Extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, V. 18, P.813-835, 2011.

Chopra PM, Johnson M, Nagy TR, Lemons JE. Micro-computed tomographic analysis of bone healing subsequent to graft placement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Feb;88(2):611-8. doi: 10.1002/jbm.b.31232. PMID: 18837447.

De Santis E, Lang NP, Ferreira S, Rangel Garcia I Jr, Caneva M, Botticelli D. Healing at implants installed concurrently to maxillary sinus floor elevation with Bio-Oss® or autologous bone grafts. A histo-morphometric study in rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2017 May;28(5):503-511. doi: 10.1111/clr.12825. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26969193.

Develioglu H, Unver Saraydin S, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dent Mater J*. 2009 Jul;28(4):396-400.

Duailibe de Deus, CB & Garcia Júnior, IR. Regeneração óssea após elevação do assoalho do seio maxilar de coelhos com hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato em grânulos e pasta: análise tomográfica, microtomográfica, histológica, histomorfométrica e imunoistoquímica. Araçatuba; s.n; 2018. 92 p

Farina R, Pramstraller M, Franceschetti G, Pramstraller C, Trombelli L. Alveolar ridge dimensions in maxillary posterior sextants: a retrospective comparative study of dentate and edentulous sites using computerized tomography data. *Clin Oral Implants Res*. 2011; 22:1138–1144.

Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. *Bone Joint J.* 2016 Jan;98-B(1 Suppl A):6-9. doi: 10.1302/0301-620X.98B.36350. PMID: 26733632.

Gomes-Ferreira, Pedro & Noronha Lisboa-Filho, Paulo & Carolina da Silva, Ana & Bimjúnior, Odair & Roberto de Souza Batista, Fábio & Cláudia Ervolino Silva, Ana & GarciaJúnior, Idelmo & Okamoto, Roberta. (2019). Sonochemical time standardization for bioactive materials used in perimplantar defects filling. *Ultrasonics Sonochemistry.* 10.1016/j.ultsonch.2019.04.032

Grossi-Oliveira G, Faverani LP, Mendes BC, Braga Polo TO, Batista Mendes GC, de Lima VN, Ribeiro Júnior PD, Okamoto R, Magro-Filho O. Comparative Evaluation of Bone Repair with Four Different Bone Substitutes in Critical Size Defects. *Int J Biomater.* 2020 May 23;2020:5182845.

Gunilla N, Thomas D, Goran GÖRAN G, Gert H, Margareta H, et al. Qualitative studies of patients' perceptions of loss of teeth, the edentulous state and prosthetic rehabilitation: A systematic review with meta-synthesis. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2013; 71: 938–952

Hilding, J.; Grulke, E.A.; Zhang, Z.G.; Lockwood, F. Dispersion Of Carbon Nanotubes in Liquids. *Journal Of Dispersion Science And Technology*, V. 24, N. 1, P. 1-41. 2003

Hughes SS, Hicks DG, O'Keefe RJ, Hurwitz SR, Crabb ID, Krasinskas AM, Loveys L, Puzas JE, Rosier RN. Shared phenotypic expression of osteoblasts and chondrocytes in fracture callus. *J Bone Miner Res.* 1995 Apr;10(4):533-44. doi: 10.1002/jbmr.5650100405. PMID: 7610923.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010 Jun 29;8(6):e1000412

Kim YJ, Saiki CET, Silva K, Massuda CKM, de Souza Faloni AP, Braz-Silva PH, Pallos D, Sendyk WR. Bone Formation in Grafts with Bio-Oss and Autogenous Bone at Different Proportions in Rabbit Calvaria. *Int J Dent.* 2020 Feb 19; 2020:2494128. doi: 10.1155/2020/2494128. PMID: 32148500; PMCID: PMC7049819.

Lekholm U, Zarb GA. Patient selection and preparation. In: Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T, editors. *Tissue-Integrated Prostheses*. Chicago: Quintessence Publishing Co; 1986. p. 199–209

Lisboa-Filho PN, Gomes-Ferreira PHS, Batista FRS, Momesso GAC, Faverani LP, Okamoto R. Bone repair with raloxifene and bioglass nanoceramic composite in animal experiment. *Connect Tissue Res.* 2018 Dec;59(sup1):97-101.

Luvizuto ER, Dias SM, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia IR Jr, Okamoto R, Dornelles RC. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone.* 2010 Apr;46(4):1021-9. doi: 10.1016/j.bone.2009.12.016. Epub 2009 Dec 28. PMID: 20036346.

Mason T.J., A.J. Cobley, J.E. Graves, D. Morgan, New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound, *Ultrasonics Sonochemistry* 18 (2011) 226–230.

Mattia P, Gian PS, Renata V, Roberto F, Leonardo T. Alveolar ridge dimensions in mandibular posterior regions: a retrospective comparative study of dentate and edentulous sites using computerized tomography data. *Surgical and Radiologic Anatomy*. 2018 Dec; 40(12): 1419

Merz WA. Die Streckenmessung an gerichteten Strukturen im Mikroskop und ihre Anwendung zur Bestimmung von Oberflächen-Volumen-Relationen im Knochengewebe [Distance measurement of directed structures in the microscope and its use in the determination of surface and volume relationship in bone tissue]. *Mikroskopie*. 1968 Feb;22(5):132-42. German. PMID: 5684814.

Miron RJ, Gruber R, Hedbom E, et al. Impact of bone harvesting techniques on cell viability and the release of growth factors of autografts. *Clin Implant Dent Relat Res* 2013;15: 481–489.

Moussa NT, Dym H. Maxillofacial Bone Grafting Materials. *Dent Clin North Am*. 2020 Apr;64(2):473-490. doi: 10.1016/j.cden.2019.12.011. Epub 2020 Feb 1. PMID: 32111281.

Nordenram G, Davidson T, Gynther G, Helgesson G, Hultin M, Jemt T, Lekholm U, Nilner K, Norlund A, Rohlin M, Sunnegårdh-Grönberg K, Tranæus S. Qualitative studies of patients' perceptions of loss of teeth, the edentulous state and prosthetic rehabilitation: a systematic review with meta-synthesis. *Acta Odontol Scand*. 2013 May-Jul;71(3-4):937-51. Epub 2012 Oct 29. PMID: 23101439.

Pang KM, Lee JK, Choi SH, Kim YK, Kim BJ, Lee JH. Maxillary Sinus Augmentation with Calcium Phosphate Double-Coated Anorganic Bovine Bone:

Comparative Multicenter Randomized Clinical Trial with Histological and Radiographic Evaluation. *Implant Dent.* 2019 Feb; 28(1): 39-45.

Park SY, Kim KH, Koo KT, Lee KW, Lee YM, Chung CP, Seol YJ. The evaluation of the correlation between histomorphometric analysis and micro-computed tomography analysis in AdBMP-2 induced bone regeneration in rat calvarial defects. *J Periodontal Implant Sci.* 2011 Oct;41(5):218-26. doi: 10.5051/jpis.2011.41.5.218. Epub 2011 Oct 31. PMID: 22087412; PMCID: PMC3213232.

Parveen, S.; Raba, S.; Fanguero, R. A Review on Nanomaterial Dispersion, Microstructure and Mechanical Properties of Carbon Nanotube and Nanofiber Reinforced Cementitious Composites. *Journal Of Nanomaterials*, V. 2013, 19 P. 2013

Pereira RDS, Bonardi JP, Ouverney FRF, Campos AB, Griza GL, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. The new bone formation in human maxillary sinuses using two bone substitutes with different resorption types associated or not with autogenous bone graft: a comparative histomorphometric, immunohistochemical and randomized clinical study. *J Appl Oral Sci.* 2020 Dec 18;29: e20200568.

Pereira RDS, Boos FB, Gorla LF, Garcia IR, Jr., Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Maxillary Sinus Elevation Surgery with ChronOS and Autogenous Bone Graft: Immunohistochemical Assessment of RUNX2, VEGF, TRAP, and Osteocalcin. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 2017;37: e321-e327

Pereira RS, Menezes JD, Bonardi JP, Griza GL, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Comparative study of volumetric changes and trabecular microarchitecture in human maxillary sinus bone augmentation with bioactive glass and autogenous bone graft: a prospective and randomized assessment. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2018 May;47(5):665-671. doi: 10.1016/j.ijom.2017.11.016. Epub 2017 Dec 13. PMID: 29246424.

Perić Kačarević Z, Kavehei F, Houshmand A, Franke J, Smeets R, Rimashevskiy D, Wenisch S, Schnettler R, Jung O, Barbeck M. Purification processes of xenogeneic bone substitutes and their impact on tissue reactions and regeneration. *Int J Artif Organs.* 2018 Nov;41(11):789-800.

Pokhrel, N.; Kiran, P.; Pala, N. Sonochemistry: Science And Engineering. *Ultrasonics Sonochemistry*, V. 29, P. 104-128. 2016.

Roumiani ME, Dorosti N. Sonochemical synthesis of a nanodandelion tin (IV) complex with carbacylamidophosphate ligand as anti-Alzheimer agent: Molecular docking study. *Ultrason Sonochem.* 2019 Jul;55:207-216.

Shyng YC, Devlin H, Riccardi D, Sloan P. Expression of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein during healing of the rat tooth-extraction socket. *Arch Oral Biol.* 1999 Sep;44(9):751-7. doi: 10.1016/s0003-9969(99)00062-x. PMID: 10471159.

Soltan M, Smiler DG, Gailani F. A new "platinum" standard for bone grafting: autogenous stem cells. *Implant Dent.* 2005 Dec;14(4):322-5.

Stern A, Green J. Sinus lift procedures: an overview of current techniques. *Dent Clin North Am.* 2012 Jan;56(1):219-33, x. PMID: 22117952.

Street J, Bao M, de Guzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 23;99(15):9656-61. Epub 2002 Jul 12.

Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials*. 2004 Mar;25(6):987-94. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00621-5. PMID: 14615163.

Tatum H Jr. Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dent Clin North Am*. 1986 Apr;30(2):207-29. PMID: 3516738.

Tatum OH Jr, Lebowitz MS. Anatomic considerations for dental implants. *J Oral Implantol*. 1991;17(1):16-21. PMID: 1942128.

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 September/October;33(5):1089–1096. Epub 2018 Jun 12.

Tong DC, Rioux K, Drangsholt M, Beirne OR. A review of survival rates for implants placed in grafted maxillary sinuses using meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:175–82.

Watanabe K, Niimi A, Ueda M. Autogenous bone grafts in the rabbit maxillary sinus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999 Jul;88(1):26-32.

Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials*. 2001 Jun;22(12):1599-606. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00312-4. PMID: 11374460.

Xu H, Shimizu Y, Asai S, Ooya K. Experimental sinus grafting with the use of deproteinized bone particles of different sizes. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Oct;14(5):548-55. PMID: 12969358.

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 Feb;15(1):126-33. doi: 10.1111/j.1600-0501.2004.01003.x. PMID: 14731186.