

Società Italiana
di Parodontologia
e Implantologia

Pattern di rimodellamento di innesto osseo bovino deproteinizzato nell'alveolo post-estrattivo: valutazione immunoistologica

Laura Dal Pozzo¹, Stefano Milani¹, Giulio Rasperini^{1,2},
Claudia Dellavia¹

¹ Dipartimento di Scienze Biomediche, Chirurgiche ed Odontoiatriche dell'Università degli Studi di Milano

² Fondazione IRCCS Ca' Granda Policlinico Milano

SIdP - Atti della Sessione di ricerca Premio H.M. Goldman - Rimini, 14 marzo 2014

RIASSUNTO

Scopo: Documentare, in vivo, l'influenza dell'osso bovino deproteinizzato sul pattern di rimodellamento osseo in un sito post-estrattivo (gruppo test), rispetto ad alveoli lasciati guarire spontaneamente (gruppo controllo). **Materiali e Metodi:** Il protocollo ha previsto la raccolta di campioni di osso alveolare contestualmente all'avulsione dentaria (T0), e a 5 mesi di guarigione (T1), al momento del posizionamento dell'impianto. Le sezioni sono state sottoposte a colorazione immunoistochimica, allo scopo di indagare l'espressione e la distribuzione di BMP-2, BMP-7, ALP, IL-6 e TNF- α . **Risultati:** Sia nel gruppo test che nel gruppo controllo si è osservato un aumento dell'espressione di BMP-2, BMP-7 e IL-6, dal T0 al T1 ($p < 0.05$). Il TNF- α appare aumentato nel gruppo test ($p < 0.05$), mentre nel gruppo controllo rimane sostanzialmente invariato dal T0 al T1. Al contrario l'espressione di ALP si riduce in entrambi i gruppi a 5 mesi di guarigione. Confrontando i due gruppi a T1, si osserva una minore espressione di BMP-2 ($p < 0.05$) e maggiore di TNF- α ($p < 0.05$) nel gruppo test. **Conclusioni:** I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare come la presenza di osso bovino deproteinizzato mantenga attivi i processi di rimodellamento tissutale, a 5 mesi di guarigione, inducendo un aumento dell'espressione dei marcatori ossei anabolici e catabolici.

INTRODUZIONE

In seguito alla perdita di un elemento dentario, l'alveolo va incontro ad un fisiologico processo di rimodellamento, che esita nella contrazione tridimensionale del volume osseo residuo¹. Dal punto di vista clinico, la precedente condizione può compromettere il successo di tutte quelle terapie volte al ripristino dell'elemento dentario mancante, pregiudicando la possibilità di ottenere un ideale posizionamento implantare e un soddisfacente risultato estetico della riabilitazione protesica. Per tale motivo negli ultimi anni sono state proposte diverse tecniche chirurgiche di preservazione alveolare, che prevedono l'utilizzo di innesti ossei (bone grafts), membrane-barriera, e fattori di crescita^{2,3,4}. Il loro obiettivo è quello di minimizzare la perdita ossea a carico del sito post-estrattivo, promuovendo la formazione di tessuti in grado di supportare l'osteointegrazione e la

stabilità primaria degli impianti. Bio-Oss® (DBB-Deproteinized Bovine Bone)(Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) è un sostituto osseo, di origine bovina, privato della componente organica e ridotto in granuli porosi di diverse dimensioni (0.25-2mm), identico dal punto di vista chimico e fisico alla porzione inorganica dell'osso umano⁵. Studi pre-clinici hanno ampiamente dimostrato la biocompatibilità di questo biomateriale e la capacità d'integrarsi nei tessuti riceventi, stabilizzando il coagulo nelle diverse fasi di guarigione e mantenendo tridimensionalmente la struttura rigenerata nel lungo periodo^{6,7,8,9}. Diversi studi clinici hanno in seguito confermato il successo del DBB nelle procedure rigenerative ossee^{10,11,12}. I primi dati istomorfometrici relativi al Bio-Oss® furono descritti da Becker et al. nel 1998: gli autori riportarono come, a 3 e 6 mesi dopo il posizionamento del biomateriale in alveoli post-estrattivi, fossero presenti particelle di DBB circondate da tessuto connettivo, con presenza marginale di osso neoformato¹³. Questi dati sono sovrapponibili a risultati ottenuti in studi successivi, nello stesso modello di guarigione^{14,15}. Lavori scientifici di recente pubblicazione, hanno infine evidenziato la presenza di una percentuale significativa di DBB a 10 anni di distanza dal suo posizionamento^{16,17}. La ragione di questo basso grado di riassorbimento in vivo del DBB, è stata indagata attraverso studi in vitro, nell'intento di analizzare la proliferazione¹⁸ e l'espressione genica^{19,20} degli osteoblasti, indotta dalle particelle d'innesto, a contatto con la piastra di coltura. I risultati hanno evidenziato una ridotta proliferazione degli osteoblasti a contatto con il DBB, rispetto ad altri sostituti ossei, oltre che una minor espressione dei fattori di rimodellamento osseo (BMP-2, BMP-7, IL-6, TNF- α). Sebbene l'espressione dei marker di rimodellamento nel contesto dei processi di guarigione alveolare spontanea sia stata oggetto d'esame negli ultimi anni²¹, in base alla nostra ricerca bibliografica, non è stato ancora pubblicato nessuno studio scientifico che descriva il medesimo aspetto in presenza di DBB, in vivo. Per tale motivo, l'obiettivo di questo lavoro è quello di descrivere il pattern di rimodellamento dell'osso bovino deproteinizzato a livello dell'alveolo post-estrattivo, e di verificare se, in una fase di guarigione tardiva (corrispondente a 5 mesi dall'estrazione), le particelle rimanenti d'innesto influenzino ancora la differenziazione osteoblastica e l'espressione delle citochine, come osservato nei precedenti studi in vitro.

MATERIALI E METODI

SELEZIONE DEI PAZIENTI

Sono stati inclusi nello studio un totale di 20 pazienti, di età compresa tra i 40 e i 70 anni, reclutati in diversi centri clinici.

Criteri di inclusione:

- Necessità d'estrazione dentaria
- Sostituzione dell'elemento dentario mediante impianto osteointegrato
- Età > 18 anni
- Assenza di patologie sistemiche rilevanti
- FMPS e FMBS < 15%

Criteri di esclusione:

- Donne in stato di gravidanza o allattamento
- Presenza di lesioni periapicali di origine endodontica
- Presenza di tasche parodontali in fase attiva con essudato purulento
- Assunzione di antibiotici nei 4 mesi precedenti l'estrazione
- Fumatori
- Storia di terapia con bifosfonati
- Assenza della parete ossea corticale vestibolare

Tutti i pazienti hanno dovuto sottoscrivere un protocollo di consenso informato formulato sulla base della Dichiarazione di Helsinki, e approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di

Milano il 20 Luglio 2011.

RANDOMIZZAZIONE

Al momento dell'avulsione del dente, il clinico ha proceduto all'apertura di una busta, dove era indicata la metodica chirurgica da assegnare al paziente. In questo modo è stato possibile suddividere i soggetti aderenti allo studio, in modo randomizzato, in due gruppi: il gruppo test e il gruppo controllo. Nel primo caso i siti post-estrattivi sono stati innestati con DBB, mentre nel secondo gruppo gli alveoli sono stati lasciati guarire spontaneamente.

PROTOCOLLO CHIRURGICO

Il protocollo ha previsto la raccolta di un campione d'osso alveolare, contestualmente all'avulsione dentaria, allo scopo di analizzare il pattern di rimodellamento osseo nel singolo paziente al baseline (T0). La biopsia ossea è stata eseguita a carico della parete laterale dell'alveolo mediante l'utilizzo di una fresa trephine, per una profondità di circa 3 mm. In seguito ad un attento curettage dell'alveolo, i siti post-estrattivi sono stati assegnati in modo randomizzato al gruppo test o al gruppo controllo. Nel primo caso si è proceduto al posizionamento delle particelle di Bio-Oss®, e di una membrana riassorbibile a copertura dello spazio innestato (Bio-Gide®, Geistlich Pharma AG, Switzerland), stabilizzata mediante sutura incrociata con Gore-Tex 5-0. Nei pazienti del gruppo controllo, invece, l'alveolo è stato lasciato guarire spontaneamente, senza utilizzare alcuna metodica di preservazione alveolare. Il dolore e l'edema postoperatori sono stati controllati con ibuprofene ed applicazione di ghiaccio nella zona perioperatoria. È stato consigliato di praticare sciacqui con collutorio a base di clorexidina allo 0,12% per 2 settimane ed evitare, per i primi giorni, di spazzolare i denti adiacenti al sito estrattivo, per evitare di traumatizzare l'area dell'intervento. A 10 giorni di guarigione sono state rimosse le suture ed i pazienti sono stati invitati a riprendere le comuni manovre di igiene orale. A 5 mesi di guarigione (T1), è stata eseguita la procedura clinica di rientro. Dopo l'allestimento di un lembo chirurgico a tutto spessore, sono stati effettuati due prelievi ossei per ogni sito mediante fresa trephine, in corrispondenza della zona di alloggiamento dell'impianto. Dopo il posizionamento dell'impianto, il lembo è stato suturato con suture singole Gore-tex 5-0.

PROCESSAZIONE ISTOLOGICA

I campioni biotipici raccolti sono stati trattati presso il laboratorio di Sezioni Sottili del Dipartimento di Scienze Biomediche, Chirurgiche ed Odontoiatriche dell'Università degli Studi di Milano. I campioni biotipici raccolti al T0 sono stati sottoposti a procedura di decalcificazione. I campioni sono stati decalcificati in EDTA, disidratati, inclusi in paraffina, e infine tagliati in sezioni longitudinali di spessore pari a 4-5 µm. Quest'ultime in parte sono state immerse in Ematossilina-Eosina per una valutazione istologica qualitativa del tessuto, in parte sono state sottoposte a colorazione immunoistochimica, allo scopo di indagare l'espressione e la distribuzione di marcatori ossei anabolici (BMP-2, BMP-7, ALP) e catabolici (TNF-α, IL-6). Le proteine morfogenetiche dell'osso sono fattori di crescita, che regolano la differenziazione delle cellule mesenchimali stromali in osteoblasti, e la loro successiva maturazione e proliferazione. La fosfatasi alcalina è un marcatore osseo, espresso sulla membrana citoplasmatica degli osteoblasti, a partire dalle fasi precoci di differenziazione cellulare. Infine IL-6 e TNF-α sono due citochine proinfiammatorie, che promuovono rispettivamente la differenziazione dei precursori osteoclastici e l'attivazione dei macrofagi, incentivando il processo di riassorbimento osseo.

Tutte le sezioni sono state osservate al microscopio ottico equipaggiato con macchina fotografica digitale, tramite la quale sono state ottenute immagini ad ingrandimento 40x e 400x. Infine è stata eseguita un'analisi semiquantitativa della marcatura ottenuta mediante colorazione immunoistochimica, attraverso il software d'immagine Photoshop.

Al T1, per ogni sito estrattivo sono state raccolte due biopsie ossee. Una di queste è stata sottoposta

a processo di decalcificazione, come precedentemente descritto, per l'esecuzione della indagine istologica ed immunoistochimica. La seconda biopsia, invece, è stata processata senza essere decalcificata, secondo il protocollo di Donath & Breuner²², per la valutazione istomorfometrica. I campioni sono stati inclusi in resina e tagliati in sezioni longitudinali di spessore pari a 50 µm, successivamente sottoposte a colorazione con Blu di Toluidina/Pironina G. In seguito le sezioni sono state osservate al microscopio ottico equipaggiato con macchina fotografica digitale, tramite la quale sono state scattate immagini ad ingrandimento 100x, sulle quali sono state eseguite le misurazioni istomorfometriche.

ANALISI STATISTICA

Lo scopo dell'analisi statistica è stato quello di confrontare i valori di marcatura rilevati al T0 e T1 per ogni fattore in ognuno dei campioni, nonché di comparare i valori di marcatura dei singoli marcatori, al T1, tra gruppo test e gruppo controllo, mediante la stima del delta normalizzato $((T1-T0)/T0)$. Le percentuali d'espressione di ogni fattore sono state analizzate mediante il programma KyPlot (Kyplot, 2012, KyesnLab INC) utilizzando un test non parametrico per campioni appaiati (Wilcoxon signed rank test) e per campioni non appaiati (Wilcoxon sum rank test), impostando un livello di significatività di $p < 0.05$

RISULTATI

ANALISI ISTOLOGICA

L'osservazione delle sezioni decalcificate e colorate con Ematossilina-Eosina, ha dimostrato che i campioni prelevati al T0 si presentano sani e privi di infiltrato infiammatorio. Nonostante la processazione istologica, l'architettura microscopica del tessuto appare preservata ed è possibile identificare le diverse componenti tissutali: il tessuto osseo compatto organizzato in lamelle, le lacune contenenti gli osteociti, gli spazi midollari costituiti da matrice collagenica, ben vascolarizzata e contenente cellule multinucleate di derivazione ematica e stromali. Nei campioni del gruppo test, prelevati al T1, si evidenziano con chiarezza le particelle di biomateriale, circondate in periferia da tessuto osseo immaturo ed osteoblasti, segno caratteristico del processo di rimodellamento dell'osso. Solo in pochi casi si è osservata la presenza di tessuto osseo lamellare maturo intorno alle particelle di biomateriale, al contrario dei campioni del gruppo controllo, dove l'osso lamellare maturo prevale sulla matrice osteoide.

ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

BMP-2

La marcatura a livello degli spazi midollari appare chiaramente visibile sia nei campioni prelevati al T0 che nei campioni prelevati al T1, in entrambi i gruppi: in particolare al T0 la marcatura appare distribuita prevalentemente in sede intracellulare, mentre al T1 è presente una duplice localizzazione intracellulare ed extracellulare, diffusa tra le fibre collagene, e intorno alle particelle d'innesto, nel caso specifico del gruppo test. Tutti i campioni hanno evidenziato una marcatura omogenea a carico della matrice ossea mineralizzata (Fig.1).

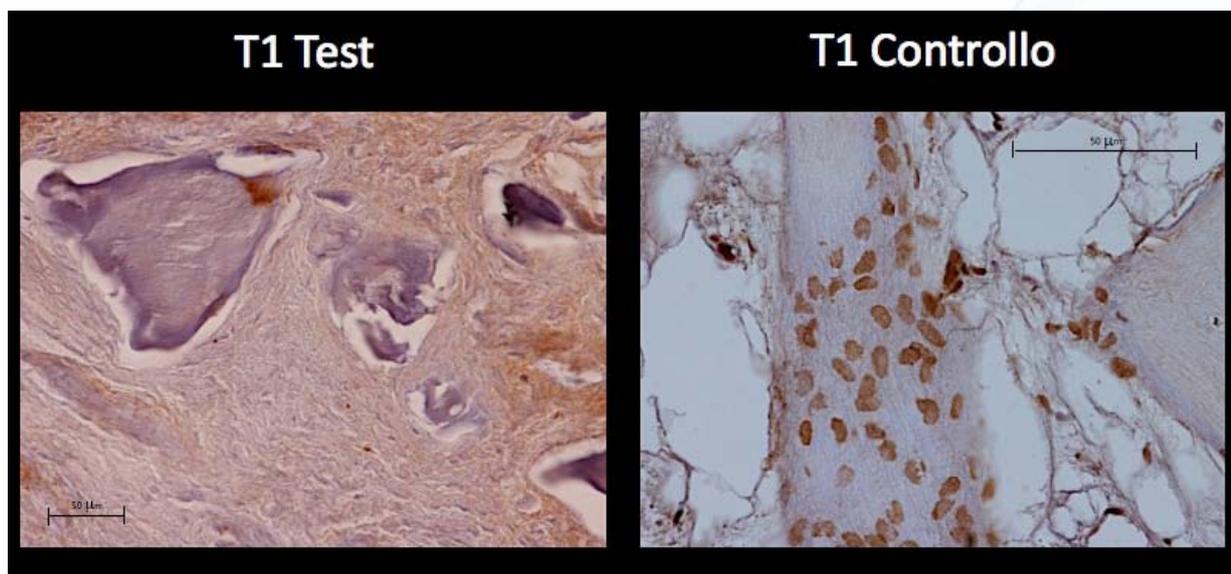


Figura 1. Immagine a sinistra: ingrandimento 400x, campioni test - T1, colorazione immunohistochimica con anticorpi anti-BMP-2. Immagine a destra: ingrandimento 600x, campioni controllo - T1, colorazione immunohistochimica con anticorpi anti-BMP-2.

BMP-7

A livello degli spazi midollari si identifica una duplice localizzazione della marcatura, sia in sede intracellulare che extracellulare, sia al T0 che al T1 di entrambi i gruppi. A differenza delle BMP-2, non si evidenzia alcuna marcatura a carico della matrice ossea mineralizzata, ma tale fattore appare distribuito prevalentemente all'interno degli osteociti intrappolati nelle lacune ossee (Fig. 2).

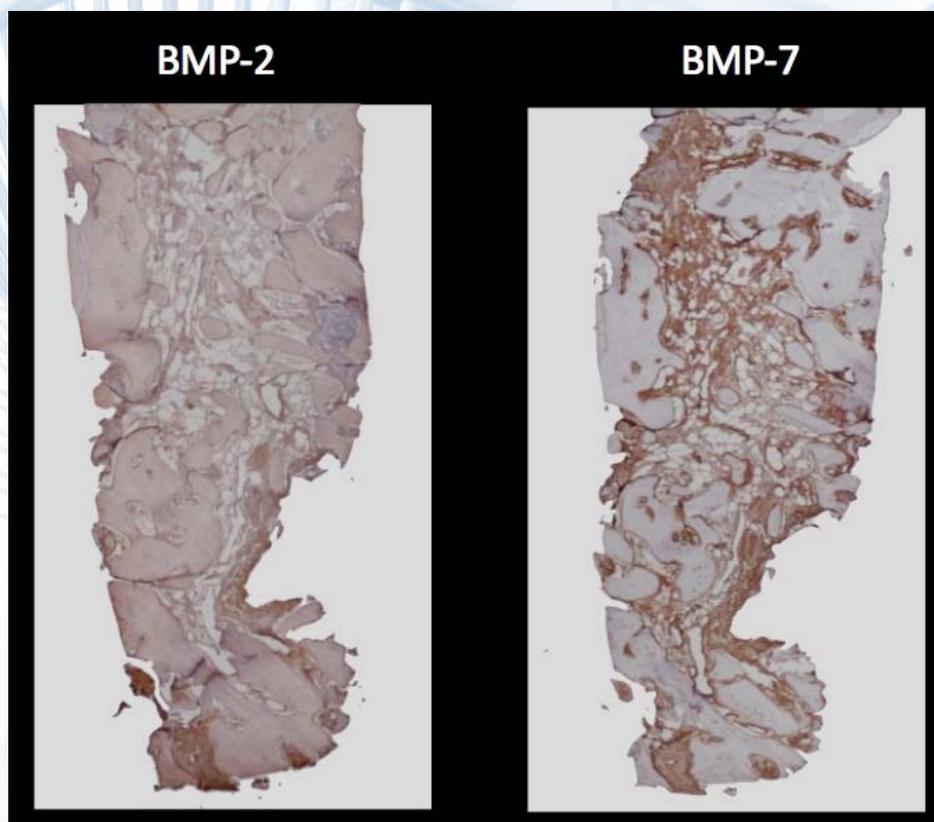


Figura 2. Gruppo controllo - T0, ingrandimento 40x, colorazione immunohistochimica con anticorpi anti-BMP2 e anti-BMP7, controcolorazione con Ematossilina di Mayer. Si può osservare la complementarità tra le due marcature.

ALP

La fosfatasi alcalina è localizzata in tutti i campioni esclusivamente in prossimità della periferia del tessuto osseo lamellare, a livello del fronte di rimodellamento (Fig.3). Non è visibile al contrario alcuna marcatura in corrispondenza delle particelle di DBB, della matrice calcificata e delle cellule osteocitarie.

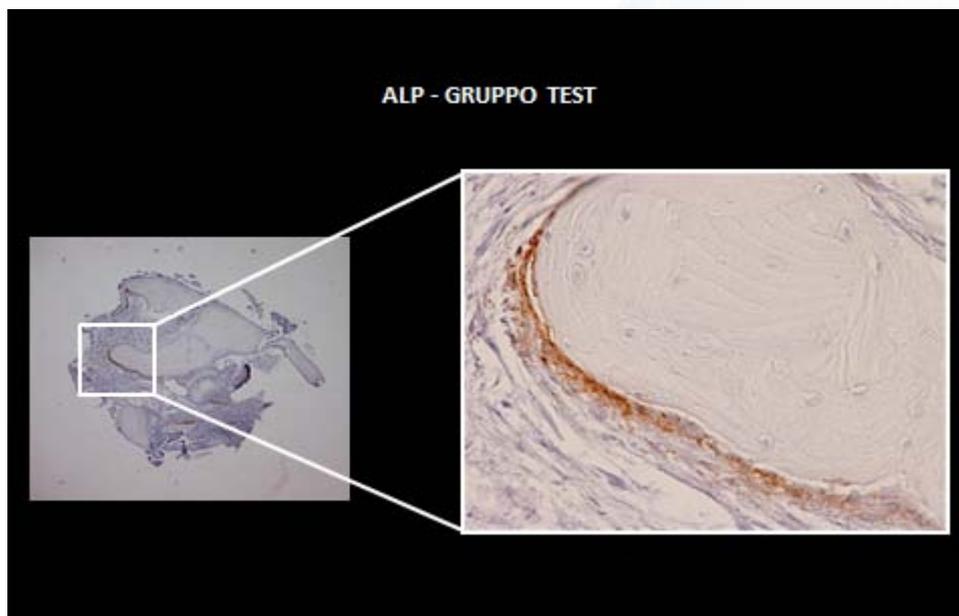


Figura 3. Gruppo test - T0, ingrandimento 40x e 400x, colorazione immunohistochimica con anticorpi anti-ALP, controcolorazione con Ematossilina di Mayer.

IL-6

Questa citochina appare distribuita in tutti i campioni per lo più in sede extracellulare, a livello degli spazi midollari, come una marcatura diffusa, o localizzata a spot tra le fibre collagene. La marcatura appare evidente anche alla periferia delle particelle di biomateriale, nel gruppo test (Fig. 4).

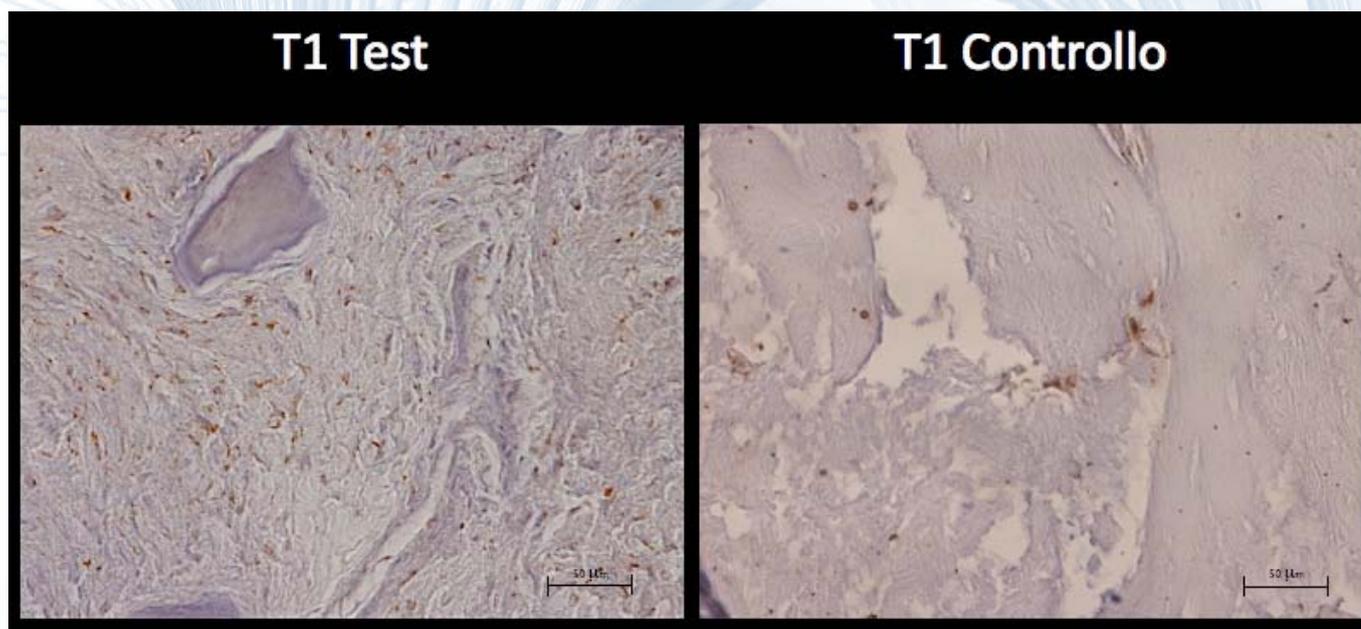


Figura 4. Gruppo test e gruppo controllo - T1, ingrandimento 400x, colorazione immunohistochimica con anticorpi anti-IL6, controcolorazione con Ematossilina di Mayer.

TNF- α

In entrambi i gruppi, sia al T0 che al T1, si evidenzia una lieve marcatura extracellulare a livello della matrice collagenica degli spazi midollari. In particolar modo nei campioni test al T1 la marcatura osservata è più diffusa ed evidente, con una distribuzione anche in prossimità delle particelle di biomateriale. (Fig.5)

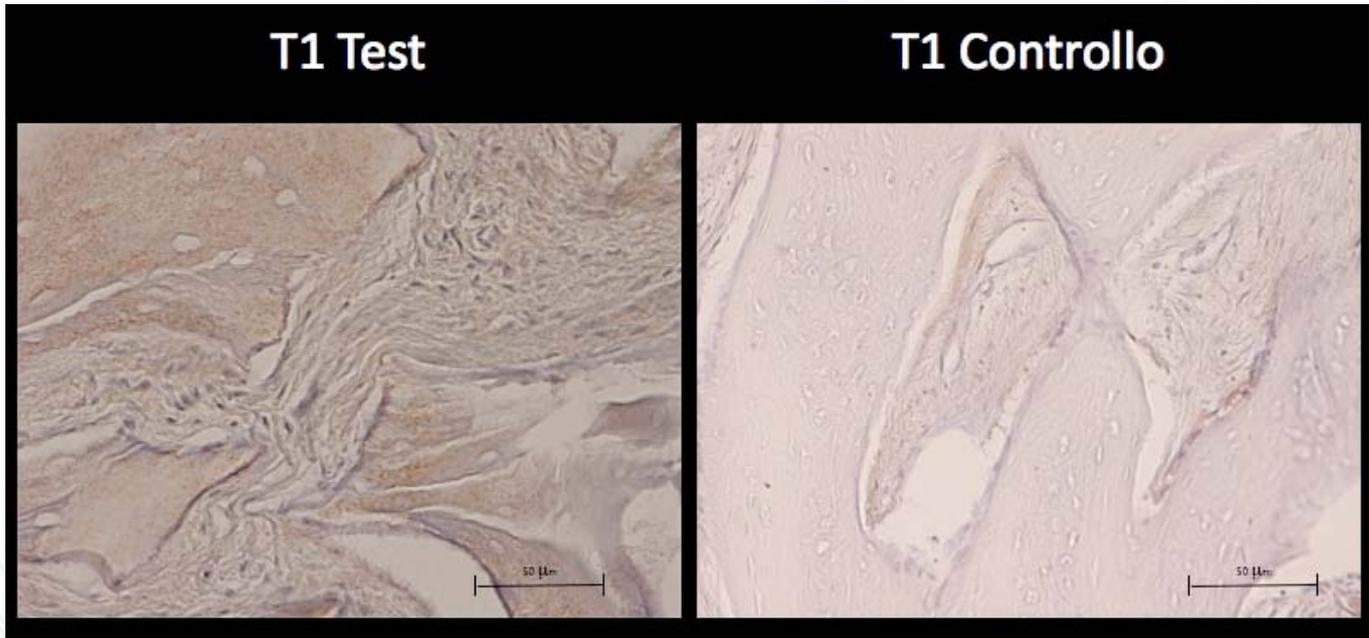


Figura 5. Gruppo test e gruppo controllo - T1, ingrandimento 400x, colorazione immunoistochimica con anticorpi anti-TNF- α , controcolorazione con Ematossilina di Mayer.

ANALISI ISTOMORFOMETRICA

All'analisi istologica quantitativa i campioni non decalcificati, prelevati al T1, hanno mostrato la seguente composizione nei due gruppi (Fig. 6).

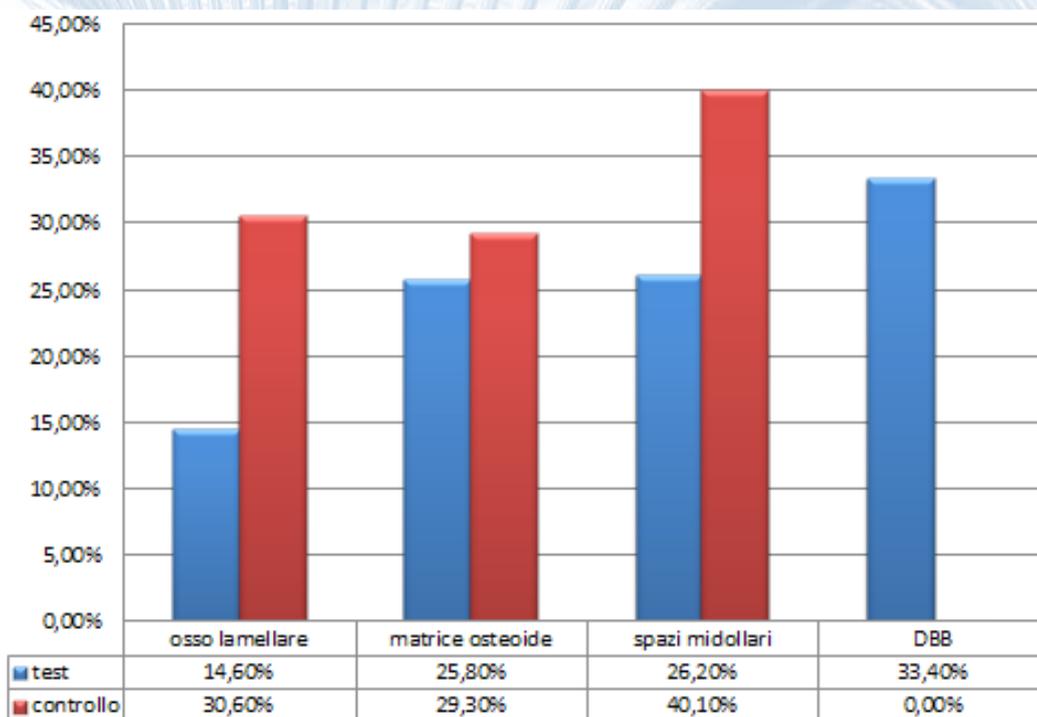


Figura 6. Dati istomorfometrici del gruppo test (colore blu) e del gruppo controllo (colore rosso).

I risultati istomorfometrici del gruppo test permettono di rilevare la presenza di una quota ancora importante di biomateriale a distanza di 5 mesi, e confermano il basso grado di riassorbimento del DBB. La presenza di spazi midollari e di ponti di tessuto osseo neoformato, che circondano le particelle d'innesto, permette di dimostrare che il processo di formazione ossea e di osteointegrazione è già in atto, anche se in una fase ancora precoce. Questo concetto è ulteriormente convalidato dalle differenze evidenziate tra il gruppo test e il gruppo controllo, il quale mostra invece una quota maggiore d'osso lamellare maturo.

ANALISI STATISTICA

Sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i campioni T0 e T1, in entrambi i gruppi, per i seguenti fattori: BMP-2, BMP-7, IL-6 e ALP ($p < 0.05$). Nel caso specifico di ALP è stata notata una diminuzione dell'espressione di questo fattore tra T0 e T1, sia nel gruppo test che nel gruppo controllo; al contrario per tutti gli altri fattori è stata evidenziata un'aumentata marcatura. Per quanto riguarda il TNF- α è stato stimato un aumento statisticamente significativo tra il T0 e il T1 nel gruppo test, contrariamente al gruppo controllo, dove la marcatura appare sostanzialmente invariata (Fig.7).

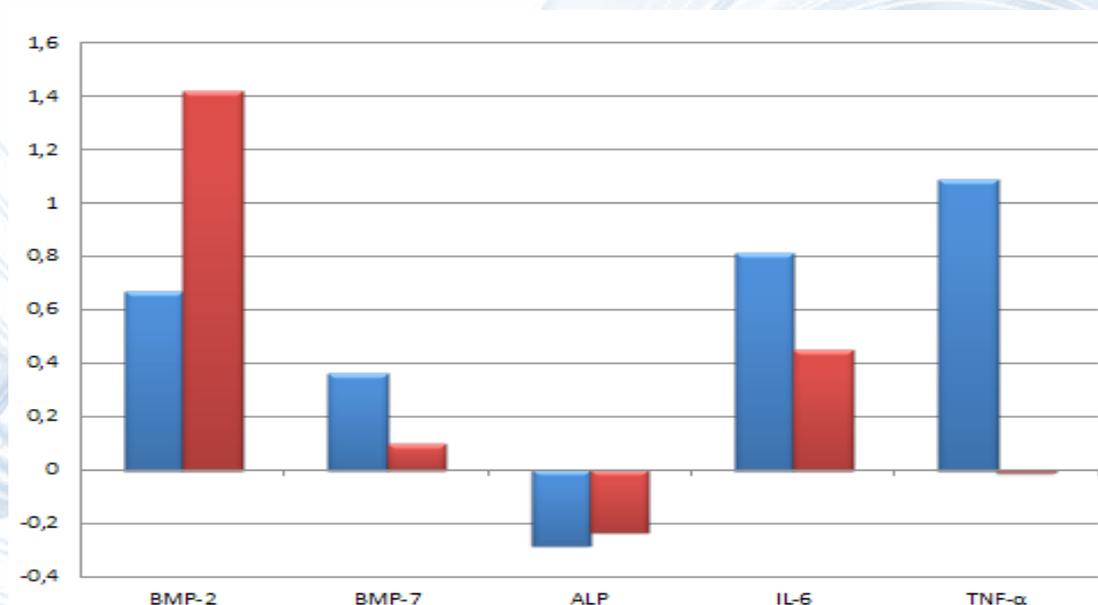


Figura 7. Stima del Δ normalizzato tra T0 e T1, per ogni marcatore, nel gruppo test (colore blu) e controllo (colore rosso).

L'espressione di ciascun marcatore inoltre è stata confrontata tra i due gruppi al T1: dai risultati ottenuti si osserva una differenza statisticamente significativa per le BMP-2, che risultano più espresse nel gruppo controllo ($p < 0.05$) e per il TNF- α maggiormente espresso nel gruppo test ($p < 0.05$), mentre non sussistono differenze statisticamente significative per i rimanenti marker.

CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti, pur consci della ristrettezza numerica del campione in analisi, è stato possibile osservare come, anche in presenza di DBB, i processi di neoformazione ossea siano attivi in una fase tardiva di guarigione, mostrando un'incrementata espressione delle proteine morfogenetiche (BMP-2, BMP-7) dal tempo dell'estrazione al momento del posizionamento implantare. L'aumento osservato è stato paragonabile a quanto rilevato nel gruppo controllo, sottolineando come, nelle dinamiche biologiche di rimodellamento in vivo, le particelle di DBB non influenzino negativamente la proliferazione e la differenziazione osteoblastica. Parallelamente all'aumento dei marker positivi, nel gruppo test, si è rilevata una maggior espressione dei fattori catabolici (IL-6, TNF- α), che rispecchiano i processi di rimodellamento in corso a carico sia del tessuto osseo autologo che del

biomateriale innestato. Nel gruppo controllo sono stati osservati risultati simili, ad eccezione di una minor espressione di TNF- α al T1. TNF- α , infatti, è un fattore che stimola la fagocitosi macrofagica, e di conseguenza appare particolarmente rappresentato in presenza dell'innesto, poichè ne guida il processo di riassorbimento; la sua carenza nel gruppo controllo, è quindi riconducibile all'assenza di DBB. Nel confronto tra i due gruppi al T1, è stata inoltre stimata una minore espressione di BMP-2 da parte delle cellule osteoblastiche, nel gruppo test, analogamente a quanto osservato negli studi in vitro. BMP-2, oltre a stimolare la differenziazione e proliferazione osteoblastica, è strettamente collegata all'espressione di osteocalcina, una proteina non collagenica che regola i processi di mineralizzazione della matrice ossea. La minor espressione di BMP-2 osservata nel gruppo test può fornire una spiegazione biologica alla presenza di una quantità minore d'osso lamellare maturo osservato nel gruppo con DBB, rispetto ai siti controllo. In conclusione, dai dati provenienti dalle nostre analisi, è possibile affermare che il DBB garantisce la vitalità dei processi biologici di rimodellamento tissutale; nonostante ciò la presenza del biomateriale influenza l'andamento di tali dinamiche di guarigione, portando ad una minor espressione di BMP-2 e maggiore di TNF- α rispetto ai siti guariti spontaneamente. Per questo motivo, per quanto sia deducibile dalla casistica in esame, DBB trova indicazione quando il mantenimento tridimensionale del volume osseo sia di primaria importanza; mentre in tutti i casi in cui la promozione delle dinamiche biologiche sia prioritaria rispetto alla preservazione del volume alveolare, è da preferirsi una guarigione di tipo spontaneo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Araùjo MG, Lindhe E. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*, 2005; 32:212-218.
- 2) Vignoletti F, Matesanz P, Rodrigo D, Figuero E, Martin C, Sanz M. Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. *Clin Oral Implants Res*, 2011; 23:22-38.
- 3) Horowitz R, Holtzclaw D, Rosen PS. A Review on Alveolar Ridge Preservation Following Tooth Extraction. *J Evidence Based Dental Practice*, 2012; 12(3):149-160.
- 4) Vittorini Orgeas G, Clementini M, De Risi V, De Sanctis M. Surgical Techniques for Alveolar Socket Preservation: A Systematic Review. *Int J Oral & Maxillofac Implants*, 2013; 28(4):1049-1061.
- 5) Gross J. Bone grafting materials for dental applications: a practical guide. *Compendium* 1997; 18:1013-36.
- 6) Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*, 1997; 8:117-24.
- 7) Araùjo M, Linder E, Wennström J, Lindhe J. The influence of Bio-Oss Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2008; 28:123-35.
- 8) Araùjo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res*, 2009; 20:433-40.
- 9) Araùjo MG, Linder E, Lindhe J. Bio-Oss collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res*, 2011; 22:1-8.
- 10) Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res*, 2010; 21:688-98.
- 11) Stavropoulos A, Karring T. Guided tissue regeneration combined with a deproteinized bovine bone mineral (Bio-Oss) in the treatment of intrabony periodontal defects: 6-year results from a randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*, 2010; 37:200-10.

- 12) Baldini N, De Sanctis M, Ferrari M. Deproteinized bovine bone in periodontal and implant surgery. *Dent Mater*, 2011;27:61-70.
- 13) Becker W, Clokie C, Sennerby L, Urist MR, Becker BE. Histologic findings after implantation and evaluation of different grafting materials and titanium micro screws into extraction sockets: case reports. *J Periodontol*, 1998; 69:414-21.
- 14) Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss®. *Clin Oral Implants Res*, 2003; 14:137-43.
- 15) Rasperini G, Canullo L, Dellavia C, Pellegrini G, Simion M. Socket grafting in the posterior maxilla reduces the need for sinus augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2010; 30:265-73.
- 16) Sartori S, Silvestri M, Forni F, Icaro Cornaglia A, Tesei P, Cattaneo V. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. *Clin Oral Implants Res*, 2003; 14:369-72
- 17) Mordenfeld A, Hallman M, Johansson CB, Albrektsson T. Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. *Clin Oral Implants Res*, 2010; 21:961-70.
- 18) Kubler A, Neugebauer J, Oh JH, Scheer M, Zöller JE. Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes: an in vitro study. *Implant Dentistry* 2004; 13:171-9
- 19) Turhani D, Weissenböck M, Watzinger E, Yerit K, Cvikl B, Ewers R, Thurnher D. In vitro study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34(5):543-50.
- 20) Amerio P, Vianale G, Reale M, Muraro R, Tulli A, and Piattelli A. The effect of deproteinized bovine bone on osteoblast growth factors and proinflammatory cytokine production. *Clin Oral Implants Res*, 2010; 21(6):650-5.
- 21) Trombelli L, Farina R, Marzola A, Bozzi L, Liljenberg B, Lindhe J. Modeling and remodeling of human extraction socket. *J Clin Periodontol* 2008; 35:630-39.
- 22) Donath, K. & Breuner, G.A. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue. *Journal of Oral Pathology* 1982;11:318-325