UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO – FORP

ANTONIO AZOUBEL ANTUNES

**Tratamento de defeitos ósseos cervicais com materiais
osseocondutores porosos imediatamente à instalação de
implantes: Estudo histológico, histométrico, micro-tomográfico
e de análise de frequência de ressonância em cães**

RIBEIRÃO PRETO
2013

ANTONIO AZOUBEL ANTUNES

**Tratamento de defeitos ósseos cervicais com materiais
osseocondutores porosos imediatamente à instalação de
implantes: Estudo histológico, histométrico, micro-tomográfico
e de análise de frequência de ressonância em cães**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto – USP, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor
em Ciências – Programa: Odontologia
(Periodontia) – Área de concentração: Cirurgia
Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Salata

**RIBEIRÃO PRETO
2013**

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

Antunes, Antonio Azoubel

Tratamento de defeitos ósseos cervicais com materiais osseocondutores porosos imediatamente à instalação de implantes: Estudo histológico, histométrico, micro-tomográfico e de análise de frequência de ressonância em cães , 2013.

119 p. : il. 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Salata, Luiz Antonio.

1. Biomateriais. 2. Formação óssea. 3. Porosidade. 4. Reabsorção óssea. 5. Implantes dentários.

Nome: ANTUNES, Antonio Azoubel
Título: Tratamento de defeitos ósseos cervicais com materiais osseocondutores porosos imediatamente à instalação de implantes: Estudo histológico, histométrico, micro-tomográfico e de análise de frequência de ressonância em cães.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências – Programa: Odontologia (Periodontia) – Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Data da defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

A **Deus**, senhor de tudo, pela proteção, saúde e sabedoria nas dificuldades, sempre me guiando para os caminhos corretos a seguir;

Aos meus pais **Antonio** e **Mabel**, meu espelho para tudo na vida, pelo apoio incondicional em todos os momentos durante essa caminhada. Meus grandes exemplos de pessoas, profissionais e de valores éticos e morais. Sem vocês, não teria conseguido. Muito obrigado por tornar esse sonho realidade. Amo vocês com toda força da minha alma!

À minha esposa **Polliana**, companheira de todas as horas. Obrigado por acreditar nos meus sonhos junto comigo, por muitas vezes deixar sua própria vida de lado em função da minha e por todo apoio a cada etapa vencida. Sem você, nada teria sido possível. Te amo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, **Prof. Salata**, pelo aprendizado proporcionado e oportunidades concedidas durante esses anos. Obrigado por tornar minha pós-graduação diferente, me apresentando a um mundo inteiro que não conhecia, pela paciência e disponibilidade sempre que necessitei;

Aos meus queridos tios **Reinaldo** e **Lina** por todo apoio, acolhimento e aconchego em nossa chegada a Ribeirão Preto, tornando a adaptação à nova realidade de vida bem mais tranquila. Com vocês por perto, tudo foi mais fácil. Nunca esquecerei o que fizeram por nós;

Aos meus irmãos **Alberto** e **Adriana**, em quem me espelho, me orgulho e amo muito. Deles, nunca faltou apoio nos momentos difíceis. Essa conquista também é de vocês!

À minha avó **Zezita** e tia **Vera**, que mesmo à distância sempre participaram das minhas dificuldades e conquistas, mandando palavras positivas e torcendo pelo meu sucesso;

Ao querido **Professor Valdemar Mallet da Rocha Barros**, a quem tive o privilégio de conhecer e desfrutar de sua convivência e amizade. Para mim, o senhor é um verdadeiro exemplo de integridade, inteligência e de docência por vocação. Sempre procurarei me espelhar no senhor em meu futuro como professor. Minha eterna admiração e carinho!

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos **Darklilson, Willian, Marcus e Gustavo**. Verdadeiros irmãos que tive a sorte de conhecer. Sentirei saudades de todos os momentos de alegria, preocupações, frustrações e cumplicidade. Vocês são a conquista mais valiosa que irei levar de Ribeirão Preto. Nossa amizade é para o resto da vida!

Aos colegas de pós-graduação: **Pando, Pepato, Manu, Gileade e Helena** e em especial ao meu amigo **Evandro**, pelo companheirismo e ajuda. Cada um teve uma boa parcela de contribuição para que as metas pudessem ser alcançadas;

Aos amigos **Aldo, Fábio, Tião, Edson e Adriana** por todo apoio que me deram durante a realização desta pesquisa. Sem sua ajuda, essa tese não seria possível;

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia **Tatiana Angeli Passos Fernandes e Aparecida Dulce de Oliveira Negretti**, pela ajuda e disponibilidade;

Aos professores **Adalberto Luiz Rosa, Alexandre Elias Trivellato, Cássio Edvard Sverzut, Márcio Mateus Beloti, Paulo Tambasco de Oliveira, Samuel Porfírio Xavier e Michel Messor**a pelos conhecimentos e experiências transmitidas;

À **FAPESP**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro que possibilitou a execução deste projeto e a minha manutenção durante a pós-graduação;

À **Universidade de Pernambuco**, por ter me proporcionado a formação odontológica e de cirurgião buco-maxilo-facial. As bases sólidas de conhecimento que eu obtive foram fundamentais para prosseguir no sonho da vida docente com a pós-graduação;

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP)** pelo acolhimento e estrutura proporcionada durante a pós-graduação.

"Quando os problemas se mostram absurdos, os desafios se tornam apaixonantes."

Dom Hélder Câmara

"Paciência e perseverança tem o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem."

John Quincy Adams

RESUMO

Antunes, A.A. **Tratamento de defeitos ósseos cervicais com materiais osseocondutores porosos imediatamente à instalação de implantes: Estudo histológico, histométrico, micro-tomográfico e de análise de frequência de ressonância em cães.** 2013. 119 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O objetivo do presente estudo foi comparar a eficácia da implantação de biomateriais porosos na neoformação óssea e reparo de defeitos cervicais mandibulares em cães, com ou sem a técnica de regeneração óssea guiada (ROG). Bio-Oss Block® (BB), Bio-Oss Collagen® (BC), Bio-Oss® em grânulos (BG), osso autógeno (Ab) e coágulo (Cg) foram utilizados nas mesmas situações experimentais. Para o grupo com membrana foi utilizado o BioGide®. Doze cães foram submetidos a extrações dos pré-molares e primeiros molares mandibulares bilateralmente. Quatro meses após cinco defeitos ósseos (6 mm de diâmetro/4 mm de profundidade) foram confeccionados em um lado. Implantes de 3,3 x 10 mm foram instalados na mesial de cada defeito, proporcionando um “gap” distal de 2,7 mm. Os defeitos foram aleatoriamente preenchidos com Ab, Cg, BB, BC e BG. Os mesmos procedimentos foram executados no lado oposto após oito semanas. A membrana foi utilizada para recobrir os defeitos em metade dos lados. Os animais foram sacrificados após oito semanas. A estabilidade dos implantes foi aferida pelo Osstell Mentor®, na instalação do implante e no sacrifício. Os espécimes (n=60, sendo 3 de cada grupo) foram escaneados em micro-tomógrafo Skyscan® 1172. Após aquisição das imagens, o volume de interesse de 3,0 x 6,0 x 4,0 mm foi estabelecido e os parâmetros relativos à formação óssea foram avaliados. Todos os biomateriais foram escaneados *in vitro* para avaliação da porosidade. Utilizando a técnica de cortes por desgaste, lâminas histológicas foram confeccionadas para a avaliação histológica e histométrica de cada espécimen. As análises histométricas revelaram que o BC apresentou formação óssea semelhante ao Ab em 8 semanas sem BGd. O Cg mostrou a maior formação óssea entre os tratamentos testados em 16 semanas com BGd, e foi superior ao BB e BG em 8 semanas sem BGd ($p<0,05$). O BB exibiu pior formação óssea entre os tratamentos (8 e 16 semanas, com ou sem membrana). O BC obteve o melhor desempenho dentre os biomateriais. Todos os biomateriais foram parcialmente reabsorvidos de 8 a 16

semanas, no entanto, o BB foi encontrado em maior quantidade em comparação com os demais biomateriais ($p<0,05$). Em relação à análise da crista alveolar, o BB apresentou a menor reabsorção entre os tratamentos, com e sem BGd a 8 e 16 semanas ($p<0,05$). A aplicação da BGd proporcionou maior ISQ em 16 semanas, independentemente do material testado ($p<0,05$). A análise micro-tomográfica mostrou que quando a BGd não foi utilizada, o BG proporcionou a maior quantidade de osso no interior do defeito, seguido pelo BC ($p<0,05$). Quando o defeito foi coberto com BGd, o Ab rendeu superior formação óssea ($p>0,05$). A análise de superfície óssea mostrou valores aumentados em sítios tratados com BG, seguido por BC em 8 semanas sem BGd, e Ab em 8 semanas com BGd ($p<0,05$). O BC apresentou superfície/volume ósseo superior a 8 (com e sem BGd) e 16 semanas com BGd ($p<0,05$). O BB apresentou os menores valores em 16 semanas (sem BGd). O Cg em 16 semanas (com BGd) foi o pior entre os tratamentos aplicados ($p<0,05$). Em relação à espessura trabecular, Ab e BB apresentaram respectivamente valores maior e menor ($p<0,05$), independente do tempo experimental avaliado ou uso de membrana. A análise da porosidade dos biomateriais revelou que o BG apresentou maiores números, volume e superfície de poros fechados. O BB apresentou maiores valores de volume de poros abertos, porosidade aberta e porosidade total em comparação com os outros materiais. Conclui-se que a implantação de bloco de alta porosidade (BB) falhou em proporcionar maior reparo ósseo no interior do defeito e foi o tratamento que mais reduziu a reabsorção da crista óssea alveolar distal. Biomateriais com menor porosidade (BC e BG) apresentaram superior ou semelhante formação óssea e estabilidade dos implantes em comparação ao osso autógeno. A utilização da técnica de ROG melhorou o padrão de formação óssea em todos os tratamentos e períodos testados e reduziu a presença de tecido mole no interior do defeito. Uma relação inversa entre a porosidade dos biomateriais e a formação óssea *in vivo* foi observada no modelo experimental adotado.

Palavras-chave: Biomateriais. Formação óssea. Porosidade. Reabsorção óssea. Implantes dentários.

ABSTRACT

Antunes, A.A. **Treatment of cervical bone defects with porous osteoconductive materials in immediate implants: a histological, histometric, micro-CT and RFA study in dogs.** 2013. 119 f. Thesis (PhD) – Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The aim of this study was to compare the effectiveness of porous biomaterials in bone formation and repair of cervical mandibular defects in dogs, with or without Guided Bone Regeneration (GBR) technique. Bio-Oss Block® (BB), Bio-Oss Collagen® (BC), Bio-Oss® in granules (BG), autogenous bone (Ab) and coagulum (Cg) were used under the same experimental conditions. For the membrane group, BioGide® was used. Twelve dogs underwent bilateral extractions of mandibular premolars and first molars. After four months five bone defects (6 mm long / 4 mm deep) were prepared at one side. Implants of 3.3 x 10 mm were installed on each of mesial defect, providing a distal gap of 2.7 mm. The defects were randomly filled with Ab, Cg, BB, BC and BG. The same procedures were performed in the opposite side after eight weeks. A membrane was used to cover the defects in half of the sides. Animals were sacrificed after eight weeks. Implant stability was measured by Ostell Mentor®, at implant installation and sacrifice. The specimens (n=60, 3 in each group) were scanned in Skyscan® 1172 micro-CT scanner. A volume of interest of 3.0 x 6.0 x 4.0 mm was established and the parameters related to bone formation were evaluated. All used biomaterials were also scanned for *in vitro* porosity evaluation. Using Exakt® system, ground section of each specimen were prepared for histological and histometric assessment. Histometric analysis revealed that BC presented similar bone formation to Ab in 8 weeks without BGd. Cg showed greater bone formation between treatments at 16 weeks with BGd, and was superior to BG and BB at 8 weeks without BGd ($p<0.05$). BB exhibited worse bone formation within treatments (8 and 16 weeks, with or without membrane). BC had the best performance among biomaterials. All biomaterials were partially resorbed from 8 to 16 weeks. However, BB was found in greater amounts in comparison with other biomaterials ($p<0.05$). Regarding the alveolar crest analysis, BB had the lowest resorption between treatments with and without BGd at 8 and 16 weeks ($p<0.05$). The BGd use promoted higher final ISQ values at 16 weeks, regardless the tested treatment ($p<0.05$). Micro-CT analysis

showed that when BGd was not used, BG yielded the highest amount of bone within the defect, followed by BC ($p<0.05$). When the defect was covered with BGd, Ab yielded higher bone formation ($p>0.05$). Bone surface area analysis showed that increased values in sites treated with BG, followed by BC without BGd at 8 weeks, and Ab at 8 weeks with BGd ($p<0.05$). The BC presented greater Bone Surface Area/Bone volume at 8 (with and without BGd) and 16 weeks with BGd ($p<0.05$). BB had the lowest values at 16 weeks (without BGd). Cg presented the worst performance among treatments at 16 weeks (with BGd) ($p<0.05$). Regarding the Trabecular Thickness, Ab and BB showed the highest and lowest values, respectively ($p<0.05$), regardless of the time point or membrane use. In biomaterials porosity analysis, BG showed higher numbers, volume, and surface area of closed pores. BB had the highest volume of open pores, open porosity and total porosity compared with the other treatments. It can be concluded the use of a high porosity block (BB) failed to provide greater bone formation within the defect area and it was the treatment that better reduced distal alveolar crest resorption. Biomaterials with lower porosity (BC and BG) showed higher or similar bone formation and implant stability if compared to autogenous bone. The appliance of BGd improved bone formation in all treatments and tested periods and reduced soft tissue presence within the defect. An inverse relationship between biomaterials' *in vitro* porosity and *in vivo* bone formation was observed in the experimental model used.

Key-Words: Biomaterials. Bone formation. Porosity. Bone resorption. Dental implants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cronologia de execução dos procedimentos	36
Figura 2	Distribuição aleatória dos tipos de tratamento	36
Figura 3	Raspagem supragengival. A) Antes; B) Depois	38
Figura 4	Incisão intra-sulcular	38
Figura 5	Descolamento muco-periosteal do retalho	39
Figura 6	Odontosecções	39
Figura 7	Aspecto dos alvéolos após extração	39
Figura 8	Confecção dos defeitos ósseos com broca trefina	41
Figura 9	Etapas de confecção dos defeitos ósseos. A) Rebordo após descolamento, B e C) Confecção dos defeitos com trefina, D) Defeitos trefinados	41
Figura 10	Defeitos ósseos tratados com os diferentes biomateriais	42
Figura 11	Etapas de preparo do BB. A) Trefina posicionada no bloco, B) Bloco trefinado	42
Figura 12	A) Inserção do implante com o BB adaptado no defeito, B) Implante e material posicionados	43
Figura 13	Vista lateral da adaptação dos implantes e dos biomateriais nos defeitos	43
Figura 14	Obtenção do Ab. A e B) Clivagem dos fragmentos após confecção dos defeitos, C) Fragmentos removidos, D) Osso particulado pronto para inserção	44
Figura 15	Fresa posicionada no interior do defeito	45
Figura 16	Instalação do implante na mesial do defeito	45
Figura 17	Vista vestibular das etapas cirúrgicas (1 a 6), da confecção dos defeitos à instalação dos implantes e tratamento dos defeitos	45
Figura 18	Vista oclusal dos implantes instalados nos defeitos ósseos	46
Figura 19	A) Implantes instalados com os respectivos biomateriais; B) Implantes instalados com os respectivos biomateriais + colocação de membrana BGd	47
Figura 20	Membrana BGd recobrimdo os defeitos tratados	47
Figura 21	Reposicionamento do retalho e sutura com fio absorvível	48
Figura 22	Aparelho Osstell Mentor®	49
Figura 23	Medição da estabilidade após instalação dos implantes	49

Figura 24	Etapas de redução dos espécimes. A) Mandíbula ressecada do animal, B) Hemimandíbula reduzida e posicionada para tomada radiográfica em filme oclusal, C) Radiografia em filme oclusal indicando angulação dos cortes e D) Espécimes reduzidos	50
Figura 25	Contato osso-implante (BIC): A) Medida do perímetro total, B) Área de osso em contato com a superfície do implante. Magnificação: 10x	52
Figura 26	Área de osso formada entre as espiras do implante (BA): A) Medida da área total entre as espiras, B) Áreas de osso entre as espiras. Magnificação: 10x	52
Figura 27	Demarcação dos pontos e medidas lineares da altura da crista óssea remanescente (IS-C) e medida do ponto mais coronal de contato osso-implante (IS-B). Magnificação: 2,5x	53
Figura 28	Área do defeito demarcada para quantificação do osso neoformado, biomaterial remanescente e tecido mole. Magnificação: 2,5x	54
Figura 29	Área de tecido mole recobrindo o defeito: tecido epitelial (em amarelo) e tecido conjuntivo (em vermelho). Notar limite inferior da medida do tecido conjuntivo determinada por linha traçada do topo da crista óssea distal ao implante. Magnificação: 2,5x	54
Figura 30	Demarcação dos pontos e medidas lineares de tecido mole. Magnificação: 2,5x	55
Figura 31	Micro-tomógrafo SkyScan® 1172	56
Figura 32	Formação de novo osso a partir da superfície do implante demonstrando processo de osteogênese de contato. NO=novo osso; Magnificação: 10x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	62
Figura 33	Formação de osso imaturo e osso lamelar no interior do defeito visualizados: A) Por luz transmitida; B) Por luz polarizada. Notar áreas desorganizadas/escurecidas evidenciando osso imaturo (OI) e organizadas/claras – osso lamelar (OL); Magnificação: 10x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	62
Figura 34	Aspecto histológico do teto do defeito em contato com o tecido conjuntivo (setas). Notar predominância de osso imaturo. Magnificação: 2,5x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	63

Figura 35	Aspecto histológico do teto do defeito em contato com o tecido conjuntivo (setas). Notar partículas de biomaterial interpostas a osso imaturo. Magnificação: 2,5x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	64
Figura 36	Aspecto histológico do teto do defeito em contato com o tecido conjuntivo (setas). Notar predominância do BB com escassos focos de osso imaturo; B=biomaterial, NO=novo osso; Magnificação: 2,5x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	64
Figura 37	Aspecto histológico das partículas residuais de biomaterial envoltas por osso imaturo (A e B). Setas indicam presença de linhas de osteoblastos realizando formação de novo osso; B=biomaterial, NO=novo osso; Magnificação: 20x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	65
Figura 38	Partícula de biomaterial (B) envolvida por novo osso (NO). Notar presença de trinca na superfície do biomaterial. Magnificação: 20x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	66
Figura 39	Corte histológico evidenciando presença de células gigantes multinucleadas - osteoclastos na superfície do biomaterial (setas); B=biomaterial, NO=novo osso; Magnificação: 20x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	66
Figura 40	Aspecto histológico de escassas áreas de formação óssea na superfície do BB; B=biomaterial, NO=novo osso; Magnificação: 20x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	67
Figura 41	Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com Ab no tempo experimental de 8 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	67
Figura 42	Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com Ab no tempo experimental de 16 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	68
Figura 43	Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com Cg no tempo experimental de 8 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	68

Figura 44	Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com Cg no tempo experimental de 16 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	69
Figura 45	Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com BB no tempo experimental de 8 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	69
Figura 46	Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com BB no tempo experimental de 16 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	70
Figura 47	Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com BC no tempo experimental de 8 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	70
Figura 48	Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com BC no tempo experimental de 16 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	71
Figura 49	Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com BG no tempo experimental de 8 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	71
Figura 50	Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com BG no tempo experimental de 16 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina	72
Figura 51	Reconstruções 3D dos espécimes e VOIs de defeitos tratados com Ab: A e B) 8 semanas sem membrana; C e D) 16 semanas sem membrana; E e F) 8 semanas com membrana; G e H) 16 semanas com membrana	82
Figura 52	Reconstruções 3D dos espécimes e VOIs de defeitos tratados com Cg: A e B) 8 semanas sem membrana; C e D) 16 semanas sem membrana; E e F) 8 semanas com membrana; G e H) 16 semanas com membrana	82

Figura 53	Reconstruções 3D dos espécimes e VOIs de defeitos tratados com BB: A e B) 8 semanas sem membrana; C e D) 16 semanas sem membrana; E e F) 8 semanas com membrana; G e H) 16 semanas com membrana. Notar presença de biomaterial remanescente em amarelo	83
Figura 54	Reconstruções 3D dos espécimes e VOIs de defeitos tratados com BC: A e B) 8 semanas sem membrana; C e D) 16 semanas sem membrana; E e F) 8 semanas com membrana; G e H) 16 semanas com membrana. Notar presença de biomaterial remanescente em amarelo	83
Figura 55	Reconstruções 3D dos espécimes e VOIs de defeitos tratados com BG: A e B) 8 semanas sem membrana; C e D) 16 semanas sem membrana; E e F) 8 semanas com membrana; G e H) 16 semanas com membrana. Notar presença de biomaterial remanescente em amarelo	84
Figura 56	Reconstrução 3D de amostra de BB escaneada in vitro: A) Vista lateral, B) Vista lateral com transparência, C) Vista superior	91
Figura 57	Reconstrução 3D de amostra de BC escaneada in vitro: A) Vista lateral, B) Vista lateral com transparência, C) Vista superior	91
Figura 58	Reconstrução 3D de amostra de BG escaneada in vitro: A) Vista lateral, B) Vista lateral com transparência, C) Vista superior	91

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Médias e desvios padrões dos valores de ISQ iniciais e finais obtidos nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *= Diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p<0,05$)	61
Gráfico 2	Médias e desvios padrões dos percentuais de contato osso-implante (BIC) no defeito e total nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p>0,05$)	73
Gráfico 3	Percentual de área de osso entre as espiras (BA) no defeito e total obtidos nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p>0,05$)	74
Gráfico 4	Médias e desvios padrões das medidas lineares IS-B e IS-C de reabsorção da crista óssea distal nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *=Diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos. Análise de Kruskal-Wallis com teste post hoc de Tukey ($p<0,05$)	75
Gráfico 5	Médias e desvios padrões dos valores de área de formação óssea na região de interesse delimitada no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *=diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p<0,05$)	76
Gráfico 6	Médias e desvios padrões dos valores de área de biomaterial remanescente na região de interesse delimitada no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *=diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p<0,05$)	77
Gráfico 7	Médias e desvios padrões dos valores de área de tecido mole presente na região de interesse delimitada no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *=diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p<0,05$)	78

Gráfico 8	Médias dos valores de área de tecido epitelial e conjuntivo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p>0,05$)	79
Gráfico 9	Médias dos valores da distância linear do topo do implante ao ponto mais coronal da mucosa periimplantar (TI-CMP) nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p>0,05$)	80
Gráfico 10	Médias dos valores de distância linear do ponto mais apical da barreira epitelial ao ponto mais coronal da mucosa periimplantar (ABE-CMP) nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p>0,05$)	81
Gráfico 11	Médias e desvios padrões dos valores de volume total de osso obtidas no VOI delimitado no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p>0,05$)	85
Gráfico 12	Médias e desvios padrões dos valores de percentual de volume de osso obtidas no VOI delimitado no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p>0,05$)	86
Gráfico 13	Médias e desvios padrões dos valores de área de superfície de osso obtidas no VOI delimitado no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *=diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p<0,05$)	87
Gráfico 14	Médias e desvios padrões dos valores de área de superfície óssea por volume de osso obtidas no VOI delimitado no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *=diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p<0,05$)	88
Gráfico 15	Médias e desvios padrões dos valores de densidade de área de superfície de osso obtidas no VOI delimitado no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p>0,05$)	89

Gráfico 16	Médias e desvios padrões dos valores de espessura do trabeculado ósseo obtidas no VOI delimitado no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *=diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p < 0,05$)	90
------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de referência para o ISQ	49
Tabela 2	Distribuição dos parâmetros micro-tomográficos dos biomateriais in vitro	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ROG	Regeneração óssea guiada
e-PTFE	Politetrafluoretileno expandido
BMP-2	Proteína morfogenética óssea – Tipo 2
CEUA	Comissão de Ética no uso de animais
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
BB	Bio-Oss Block
BC	Bio-Oss Collagen
BG	Bio-Oss em grânulos
Ab	Osso autógeno
Cg	Coágulo
BGd	BioGide
SP	São Paulo
MG	Minas Gerais
RJ	Rio de Janeiro
MS	Mato Grosso do Sul
Vol.	Volumes
ISQ	Quociente de Estabilidade do Implante
BIC	Contato osso-implante
BA	Área de osso entre as espiras do implante
VOI	Volume de interesse
ROI	Região de interesse
SPSS	Statistical Package for Social Science para Windows
3D	Três dimensões

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
%	Porcento
µm	Micrômetros
kg	Kilograma
mm	Milímetro
ml	Mililitro
mg	Miligrama
ml/kg	Mililitro por kilograma
mg/kg	Miligrama por kilograma
>	Maior que
<	Menor que
pH	Potencial hidrogeniônico
°C	Graus Célsius
kV	Kilovolts
≤	Maior ou igual
mm ³	Milímetros cúbicos
mm ²	Milímetros quadrados
No	Número

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	26
2	PROPOSIÇÃO	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Animais	35
3.2	Fase cirúrgica e protocolo experimental	35
3.2.1	Etapa 1: Cirurgias de exodontia	37
3.2.2	Etapas 2 e 3: Confecção dos defeitos ósseos e instalação dos implantes	40
3.3	Mensuração da estabilidade dos implantes	48
3.4	Eutanásia dos animais	50
3.5	Processamento histológico	51
3.6	Análises histomorfométricas	52
3.7	Análise micro-tomográfica	56
3.8	Análise estatística	58
4	RESULTADOS	59
4.1	Estabilidade dos implantes	60
4.2	Análise histológica	61
4.3	Contato osso-implante (BIC)	72
4.4	Área de osso formada entre as espiras do implante (BA)	73
4.5	Reabsorção da crista óssea	74
4.6	Análise da área do defeito	75
4.7	Área de tecido mole recobrindo o defeito	78
4.8	Medidas lineares de tecido mole	79
4.9	Análise micro-tomográfica	81
4.10	Análise micro-tomográfica <i>in vitro</i> dos biomateriais	90
5	DISCUSSÃO	93
6	CONCLUSÕES	107
	REFERÊNCIAS	109

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A instalação de implantes imediatamente após extração dentária tem se constituído em procedimento comum na prática odontológica. Neste contexto a formação óssea ao redor de implantes utilizando esta técnica tem mostrado padrão histológico de osseointegração similar aos obtidos tanto em modelos de estudo em humanos (WILSON et al., 1998; PAOLANTONIO et al., 2001), como em animais (BARZILAY et al., 1996a, 1996b; KARABUDA et al., 1999; ARAÚJO et al., 2005). Achados histomorfométricos utilizando modelos de estudos em animais têm demonstrado que a instalação de implantes em alvéolos frescos resulta em marcantes alterações nas paredes alveolares e da crista óssea, no que diz respeito à altura e espessura (VIGNOLETTI et al., 2009). Essas alterações de padrão de reparo podem ser justificadas pela maior dimensão do alvéolo dental em relação ao tamanho dos implantes ocasionando, como consequência, a formação de defeito ósseo (*“gap”*) entre a superfície do implante e as paredes da crista óssea (CARMAGNOLA et al., 2003). A maneira mais efetiva de minimizar o efeito do *“gap”* na reabsorção da crista óssea alveolar se constitui no maior desafio encontrado para as pesquisas que estudam a aplicabilidade da técnica nos diferentes modelos experimentais.

Inúmeros materiais e técnicas têm sido descritas na tentativa de aumentar a previsibilidade desse tratamento em situações de alvéolo pós-extração, visando preencher espaços circunjacentes ao implante e favorecer o processo de preservação dos tecidos periimplantares e sua osseointegração (AKIMOTO et al., 1999; POLYZOIS et al., 2007; SALATA et al., 2007). Entre os métodos citados incluem-se a aplicação do princípio de Regeneração Óssea Guiada (ROG) com o uso de membranas como barreiras mecânicas, a instalação de enxertos ósseos autógenos ou alógenos para o preenchimento desses defeitos, aplicação de substitutos osseocondutores como hidroxiapatita, biovidro, ou osso bovino, ou ainda as várias combinações dessas modalidades de tratamento (BERGLUNDH E LINDHE, 1997; AKIMOTO et al., 1999; CARMAGNOLA et al., 2003; ABUSHAHBA et al., 2008). Embora a maioria dessas técnicas promova o preenchimento ósseo do defeito sob o ponto de vista clínico,

propiciando um melhor contorno alveolar e de tecido mole, não garantem que a osseointegração do implante possa ocorrer (BOTTICELLI et al., 2004; POLYZOIS et al., 2007; CANEVA et al., 2010a).

A estabilização inicial do material osseocondutor é também de suma importância para os resultados de formação óssea nessas situações. A presença de micro-movimentos pode inibir o crescimento ósseo na superfície do biomaterial, o que pode resultar em fibro-integração. Hjorting-Hansen et al. (1990), em trabalho que avaliou biópsias em humanos após aumento mandibular com hidroxiapatita em bloco e em grânulos, relataram diminuída formação óssea em sítios enxertados com grânulos em relação aos blocos, atribuindo esta deficiência às micro-movimentações dos grânulos.

A idéia de criar um sítio anatômico isolado com o objetivo de promover cicatrização foi primeiramente introduzida há aproximadamente 57 anos, em que filtros de acetato de celulose foram experimentalmente utilizados para regeneração de nervos e tendões (BASSET et al., 1956). Na região crânio-facial resultados bem sucedidos foram relatados após instalação de barreiras mecânicas sobre defeitos em calvária de ratos (MELCHER, 1969) e nos maxilares de coelhos (KAHNBERG, 1979). O conceito de ROG envolve a colocação de barreira mecânica com o objetivo de proteger o coágulo e criar um espaço isolado que permita apenas acesso de fatores de crescimento e proteínas ósseas, impedindo a migração competitiva com outros tecidos (DAHLIN et al., 1988). Uma variedade de materiais tem sido utilizada no desenvolvimento de membranas para procedimentos de ROG, dentre os quais se podem destacar os não absorvíveis, como o politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) ou reabsorvíveis, compostos de dura mater, ácido polilático, ácido poliglicólico e poliuretano (KOHAL et al., 1998). Atualmente, as membranas reabsorvíveis à base de colágeno têm sido bastante utilizadas na prática clínica, considerando as vantagens de baixa imunogenicidade, fácil manipulação e melhor modelagem aos contornos dos tecidos, sendo reabsorvidas no sítio implantado em um tempo médio de 24 semanas (BUNYARATAVEJ & WANG, 2001).

Entre os biomateriais osseocondutores o Bio-Oss® (Geistlich Biomaterials AG, Wolhusen, Switzerland), sintetizado a partir de osso bovino desproteinizado,

tem sido amplamente aplicado no tratamento de defeitos ósseos periodontais, procedimentos de elevação de seio maxilar e no reparo de alvéolos dentais para instalação de implantes, além da correção de defeitos ósseos periimplantares persistentes (BERGLUNDH e LINDHE, 1997; CARMAGNOLA et al., 2000; CARMAGNOLA et al., 2003; CARMAGNOLA et al., 2008; POLYZOIS et al., 2007; ABUSHAHBA et al., 2008; MORDENFELD et al., 2010). O Bio-Oss® é composto de várias formas de fosfato de cálcio encontradas no tecido ósseo mineralizado e assim, acredita-se que o material seja reabsorvido e substituído por osso (ARAÚJO et al., 2009). O Bio-Oss® é comercializado na forma de grânulos ou blocos: o Bio-Oss Block® resulta do processamento do bloco de osso bovino, enquanto o Bio-Oss Collagen® é uma combinação de grânulos de osso bovino cortical natural purificado e 10% de fibras colágenas em forma de bloco. A adição do colágeno facilita a manipulação deste material e age mantendo-o posicionado no sítio de implantação, o que permite uma melhor modelagem à morfologia do defeito (WONG et al., 2010).

Alguns autores relatam osseointegração similar à conseguida com o osso autógeno em defeitos ao redor de implantes, com a reabsorção e substituição das partículas de Bio-Oss® por tecido ósseo (BERGLUNDH e LINDHE, 1997; ABUSHAHBA et al., 2008), enquanto outros estudos revelam mínima reabsorção (CARMAGNOLA et al., 2000; CARMAGNOLA et al., 2003). Embora este biomaterial seja bastante utilizado como substituto ósseo em alvéolos frescos, os achados experimentais e clínicos mostram resultados bastante contraditórios (BERGLUNDH e LINDHE, 1997; CARMAGNOLA et al., 2000; POLYZOIS et al., 2007; ABUSHAHBA et al., 2008; CARMAGNOLA et al., 2008). As constatações de que o Bio-Oss® não é totalmente reabsorvido no sítio implantado (MORDENFELD et al., 2010) em longo prazo e que a persistência de partículas do biomaterial contribui para uma interface instável entre o material e o implante de titânio, foram comprovadas em estudo prévio (ANTUNES et al., 2013).

De modo geral, os estudos que utilizaram o Bio-Oss® nas diversas formas de apresentação e modelos experimentais, pouco discorrem a respeito da influência da topografia e porosidade do material sobre a formação óssea. Analisando a literatura

pertinente, a escassez de dados que relaciona os parâmetros porosidade e topografia deste biomaterial com formação óssea é observada. Têm sido mostrado que a porosidade, bem como o tamanho e a interconectividade do arcabouço dos biomateriais osseocondutores tem um importante papel na formação óssea *in vitro* e *in vivo* (HJORTING-HANSEN et al., 1990; KARAGEORGIOU & KAPLAN, 2005; CESTARI et al., 2009). Quando testada *in vitro*, a menor porosidade estimulou a osteogênese pela supressão da proliferação celular, forçando sua agregação e maturação. Por outro lado, a maior porosidade e tamanho de poros resultaram em maior crescimento ósseo *in vivo*, pelo favorecimento da infiltração de capilares e deposição de matriz óssea pelos osteoblastos. De acordo com esses trabalhos, a organização arquitetônica porosa do biomaterial em bloco é mantida, enquanto que na forma particulada a estrutura macroporosa interconectada é perdida (HJORTING-HANSEN et al., 1990; CESTARI et al., 2009).

A importância da porosidade na regeneração óssea foi demonstrada no trabalho de Kuboki et al. (1998). Utilizando um modelo experimental em ratos, fizeram implantação ectópica de partículas sólidas ou porosas de hidroxiapatita para carrear BMP-2. Não foi observada a formação de novo osso nas partículas sólidas, enquanto que osteogênese direta ocorreu na superfície das porosas. Relatos do papel da porosidade, tamanho de poros e interconectividade em biomateriais que receberão células osteoblásticas em sua superfície podem ser encontrados na literatura (KARAGEORGIOU & KAPLAN, 2005; HUTMACHER et al., 2007; KIM et al., 2010). Entretanto, não há consenso sobre a porosidade ideal e tamanho de poros mais adequado no que diz respeito à obtenção de melhor formação óssea. Sabe-se que o osso trabecular humano apresenta porosidade de aproximadamente 85% e tamanho médio de poros de 850-1200 μm (LICKORISH et al., 2007). Acredita-se que quanto mais próximo desses valores, maior seria a possibilidade de resposta biológica com favorável formação óssea (KASTEN et al., 2008). Alguns estudos puderam comprovar esta teoria utilizando arcabouços para formação óssea à base de ácido polilático/ β -tricálcio fosfato com porosidade acima dos 80% em modelos animais. Crescimento tecidual e formação óssea superiores foram observados em áreas de maior porosidade do biomaterial após implantação *in vivo*

(LEWANDROWSKI et al., 2000; ROY et al., 2003).

A despeito das já conhecidas propriedades como enxerto para aumento ósseo *inlay* ou *onlay*, não há relatos na literatura da influência da porosidade do Bio-Oss® nos resultados de formação óssea. A hipótese de que a forma mais porosa deste biomaterial proporcionaria arquitetura de trabeculado ósseo semelhante ao osso humano e por consequência seria mais eficaz na preservação das dimensões da crista óssea alveolar e reparo do defeito permanece incipiente. Adicionalmente, as três diferentes porosidades deste material ainda não foram testadas e comparadas em um mesmo modelo experimental com implantes osseointegráveis.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivos:

1. Avaliar a eficácia na implantação de biomaterial osseocondutor poroso em bloco na região cervical do implante, como arcabouço para neoformação óssea e reparo do defeito;
2. Comparar entre si os materiais Bio-Oss Block[®], Bio-Oss Collagen[®], Bio-Oss[®] em grânulos, osso autógeno e coágulo em situações experimentais com ou sem a utilização da técnica de ROG no que diz respeito à melhora da qualidade da osseointegração, formação óssea e estabilidade dos implantes;
3. Relacionar a porosidade *in vitro* dos biomateriais com as respostas biológicas de formação óssea *in vivo*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para este estudo foram utilizados 12 cães jovens, sem raça definida, pesando entre 20 e 30 kg. Os animais permaneceram em quarentena para aplicação de vacina antirrábica e tríplice, vermífugos e vitaminas e mantidos em báias individuais no Biotério II da FORP-USP no período pré e pós-operatório, sob cuidados veterinários, com livre acesso à água e suporte nutricional padrão de laboratório durante todo o período de experimentação. O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, sob o Nº 12.1.1317.53.2 e financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo Nº 2011/08911-7), com bolsa de Doutorado Direto associada ao projeto (processo Nº 2011/09015-5).

3.2 FASE CIRÚRGICA E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

A fase cirúrgica do experimento foi realizada em três etapas: a primeira consistiu nas exodontias bilaterais dos quatro pré-molares e primeiros molares mandibulares. O segundo momento cirúrgico foi realizado 16 semanas após as exodontias, em que foram confeccionados cinco defeitos ósseos sobre o rebordo alveolar mandibular unilateralmente. Esses defeitos foram tratados com Bio-Oss Block® (BB) (Geistlich®, Wohlhusen, Suíça), Bio-Oss Collagen® (BC) (Geistlich®, Wohlhusen, Suíça), Bio-Oss® (BG) (Geistlich®, Wohlhusen, Suíça) (partículas com tamanho de 0,25 a 1 mm), osso autógeno particulado (Ab) e coágulo (Cg), com distribuição determinada de forma randomizada para os cinco defeitos. Concomitantemente à colocação dos biomateriais, foi instalado um implante em cada defeito. Após oito semanas a terceira etapa, em que outros cinco defeitos

foram confeccionados no lado contralateral, e realizados os mesmos procedimentos já descritos para o lado anterior (figura 1).

Figura 1 - Cronologia de execução dos procedimentos.

Para que as variáveis fossem testadas em um mesmo animal, cada defeito ósseo circunferencial mandibular recebeu, em sistema de distribuição aleatória, um dos tipos de tratamento a serem testados (figura 2).

Figura 2 - Distribuição aleatória dos tipos de tratamento.

Desta forma, os respectivos grupos foram assim distribuídos:

- 1) **Grupo 8 semanas sem membranas:** confecção de 30 defeitos (06 lados), tratados de forma aleatória e equilibrada com as cinco possibilidades de preenchimento concomitantemente à instalação dos implantes, sem o uso do princípio de ROG;
- 2) **Grupo 8 semanas com membranas:** confecção de 30 defeitos (06 lados), tratados de forma aleatória e equilibrada com as cinco possibilidades de preenchimento concomitantemente à instalação

dos implantes, com o uso do princípio de ROG;

- 3) **Grupo 16 semanas sem membranas:** confecção de 30 defeitos (06 lados), tratados de forma aleatória e equilibrada com as cinco possibilidades de preenchimento concomitantemente à instalação dos implantes, sem o uso do princípio de ROG;
- 4) **Grupo 16 semanas com membranas:** confecção de 30 defeitos (06 lados), tratados de forma aleatória e equilibrada com as cinco possibilidades de preenchimento concomitantemente à instalação dos implantes, com o uso do princípio de ROG;

3.2.1 ETAPA 1: CIRURGIAS DE EXODONTIA

Todos os animais foram submetidos a cirurgias de exodontias bilaterais dos quatro pré-molares e primeiro molar mandibulares. Para tal, os animais foram pré-anestesiados por meio de injeção intramuscular de Rompun® 2% (Xilazina, Bayer Healthcare Pharmaceuticals®, Berlin, Alemanha) na dosagem de 0,05 ml/kg, 30 minutos antes do ato operatório. A seguir, por via endovenosa, foi realizada a anestesia geral com Thiopentax® 1% (Tiopental sódico, Cristália Produtos químicos farmacêuticos LTDA., Itapira, SP), na dosagem de 1 ml/kg (solução de 20 mg/kg diluído em 50 ml de soro fisiológico estéril a 0,9%). Durante todo o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos com solução isotônica de cloreto de sódio (Glicolabor Ind. Farm. Ltda., São Paulo, SP) a 0,9% com 2,5% de glicose. Antes do início do procedimento cirúrgico, todos os dentes maxilares e mandibulares foram submetidos à raspagem supragengival bilateralmente (figura 3). A antisepsia extraoral foi realizada com PVPI® tópico (polivinilpirrolidona, Rioquímica®, Barretos, SP) e a antisepsia intraoral realizada com Cepacol® (cloreto de cetilpiridíneo a 50%, Aventis Pharma Ltda., Suzano, SP) e água oxigenada a 10 vol. (Farmax®, Divinópolis, MG). Após aposição dos campos cirúrgicos estéreis sobre o animal, foi realizada anestesia local infiltrativa bilateral na região dos pré-molares e

molares inferiores, utilizando-se 1,8 ml de anestésico local Scandicaine® (mepivacaína a 2% com noradrenalina 1:100.000, Septodont, Distribuidora DFL Ind. Com. Ltda., Rio de Janeiro, RJ).

Figura 3 - Raspagem supragengival. A) Antes; B) Depois.

Em seguida foi realizada incisão intra-sulcular e descolamento de retalho muco-periosteal bilateralmente (figuras 4 e 5). Os quatro pré-molares inferiores e primeiro molar foram seccionados com o auxílio de turbina de alta rotação e broca cirúrgica 702 (figura 6) e extraídos com o emprego de fórceps e/ou elevadores sem danificar as paredes alveolares (figura 7). Os retalhos foram então reposicionados e suturados com fio Mononylon® 4-0 (Ethicon®, Johnson & Johnson®, São José dos Campos, SP).

Figura 4 - Incisão intra-sulcular.

Figura 5 - Descolamento muco-periosteal do retalho.

Figura 6 - Odontosecções.

Figura 7 - Aspecto dos alvéolos após extração.

Durante o período de recuperação da anestesia os animais foram mantidos em sala individual de recuperação, permanecendo por 24 horas e depois transferidos para baias do Biotério II da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, onde permaneceram durante todo o período experimental. Os animais foram acompanhados durante um período de reparo alveolar de 16 semanas. Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo cirurgião, dentro de padrões assépticos e com irrigação abundante de solução salina de cloreto de sódio a 0,9% (Glicolabor Ind. Farm. Ltda., São Paulo, SP) para manutenção da vitalidade óssea. Durante o período pós-operatório precoce, os animais receberam o analgésico Anagon[®] de 50 mg (cloridrato de tramadol, Laboratórios Biosintética Ltda.[®] – São Paulo – SP) administrado por via endovenosa, na dosagem de 3 mg/kg de peso do animal, uma vez ao dia durante 3 a 4 dias. Para a antibioticoterapia, utilizou-se o Pentabiótico Veterinário[®] (Fort Dodge[®], Agroline, Campo Grande, MS), em suspensão, na dose de 0,5 mg/kg. Quaisquer anormalidades, tais como mudanças de hábitos alimentares, inflamação ou infecção dos tecidos, foram devidamente registradas e tratadas pelo médico veterinário.

3.2.2 ETAPAS 2 E 3: CONFECÇÃO DOS DEFEITOS ÓSSEOS E INSTALAÇÃO DOS IMPLANTES

Após o período de 16 semanas de reparo alveolar, cada animal foi submetido à nova cirurgia, para a confecção de defeitos ósseos padronizados apenas em um lado da mandíbula. Para tal, os procedimentos pré-operatórios de anestesia e antisepsia foram os mesmos já descritos anteriormente. Após a infiltração do anestésico local, foi realizada incisão com lâmina de bisturi nº 15 sobre a crista do rebordo alveolar no lado correspondente, envolvendo desde o dente canino até o segundo molar para a exposição total do rebordo mandibular, agora desdentado. Em seguida, cinco defeitos com 4 mm de profundidade e equidistantes entre si foram cirurgicamente produzidos utilizando brocas trefina de 6 mm de diâmetro (figuras 8 e 9).

Figura 8 - Confecção dos defeitos ósseos com broca trefina.

Figura 9 - Etapas de confecção dos defeitos ósseos. A) Reborde após descolamento, B e C) Confecção dos defeitos com trefina, D) Defeitos trefinados.

Após a confecção cirúrgica dos cinco defeitos ósseos alveolares, estes foram preenchidos individualmente por BB, BC, BG, Ab ou Cg (figura 10). Para utilização do BB, o mesmo foi submetido a preparo prévio, com o auxílio de uma trefina de 6 mm, e depois cortado e adaptado à profundidade do defeito (figura 11).

Figura 10 - Defeitos ósseos tratados com os diferentes biomateriais.

Figura 11 - Etapas de preparo do BB. A) Trefina posicionada no bloco, B) Bloco trefinado.

Após adaptação do bloco, implantes osseointegráveis foram instalados ao limite da margem mesial do defeito, viabilizando, assim, o travamento no bloco do biomaterial na sua região cervical e distal (figuras 12 e 13).

Figura 12 - A) Inserção do implante com o BB adaptado no defeito, B) Implante e material posicionados.

Figura 13 - Vista lateral da adaptação dos implantes e dos biomateriais nos defeitos.

A aquisição de Ab se deu pela remoção do osso com a broca trefina de 6,0 mm de diâmetro no momento da confecção dos defeitos ósseos em todos os sítios. Os fragmentos ósseos trefinados obtidos foram particulados para posterior inserção nos defeitos (figura 14).

Figura 14 - Obtenção do Ab: A e B) Clivagem dos fragmentos após confecção dos defeitos; C) Fragmentos removidos; D) Osso particulado pronto para inserção.

Cada animal foi submetido à inserção de cinco implantes osseointegráveis do tipo EasyGrip® de superfície vulcano-actives (obtida por anodização) de 3,3 x 10 mm (Conexão®, Arujá, SP) sobre os defeitos ósseos em cada lado do rebordo mandibular. Todos os procedimentos pré-operatórios de anestesia e antisepsia, assim como os procedimentos cirúrgicos para obtenção de retalho muco-periosteal foram os mesmos já descritos anteriormente. Após exposição do leito ósseo receptor, o preparo dos sítios ósseos para instalação dos implantes após a confecção dos defeitos circunferenciais foi cirurgicamente padronizado e realizado sob copiosa irrigação com solução de soro fisiológico estéril a 0,9%, conforme recomendações do fabricante. Utilizando as fresas: lança, 2,0 mm e 2,8 mm (Conexão®, Arujá, SP) (figura 15), cinco sítios implantares com 10 mm de profundidade tangenciando a parede mesial dos defeitos ósseos foram confeccionados. Logo em seguida, os implantes foram instalados nos sítios recém-preparados (figuras 16 e 17). Parafusos cicatrizadores de 4 mm de altura (Conexão®, Arujá, SP) foram então colocados.

Figura 15 - Fresa posicionada no interior do defeito.

Figura 16 - Instalação do implante na mesial do defeito.

Figura 17 - Vista vestibular das etapas cirúrgicas (1 a 6), da confecção dos defeitos à instalação dos implantes e tratamento dos defeitos.

Após um período de 8 semanas, os procedimentos de confecção dos defeitos ósseos circunferenciais descritos anteriormente e realizados inicialmente em apenas um lado da mandíbula dos doze cães, foram realizados da mesma forma no lado contralateral. O travamento dos implantes para ambos os lados foi realizado apenas na parede mesial e no terço apical do alvéolo cirurgicamente produzido, já que sua porção cervical apresentava um diâmetro mais alargado (2,7 mm de “gap” na distal) em relação ao diâmetro dos implantes (3,3 mm de diâmetro). O travamento na região cervical dos implantes, onde se encontravam os biomateriais ocorreu de forma passiva. Assim, com a instalação dos implantes imediatamente após a confecção desses defeitos ósseos, a porção coronal de 4,0 mm dos implantes apresentava um defeito circunferencial (“gap”) de 2,7 mm de distância para a parede distal do alvéolo, simulando uma situação de instalação imediata de implante em alvéolos pós-extração (figura 18). Todos os implantes foram instalados de modo que sua plataforma fosse posicionada ao nível da crista óssea mesio-distalmente. No total, 120 implantes foram instalados em todos os sítios experimentais.

Figura 18 - Vista oclusal dos implantes instalados nos defeitos ósseos.

Após confecção de todos os defeitos dos dois grupos, instalação dos implantes e preenchimento dos defeitos com os tratamentos propostos, seis lados mandibulares em cada tempo experimental foram recobertos com membrana BGD de 30 x 40 mm, para que o princípio de ROG pudesse ser aplicado, comparando-se assim com os padrões de reparo dos defeitos não recobertos por membranas (figuras 19 e 20).

Figura 19 - A) Implantes instalados com os respectivos biomateriais; B) Implantes instalados com os respectivos biomateriais + colocação de membrana BGd.

Figura 20 - Membrana BGd recobrindo os defeitos tratados.

Ao final do procedimento, o retalho foi reposicionado cuidadosamente e suturado com fio de sutura absorvível Vicryl® 4-0 (poliglactina 910, Ethicon®, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP) (figura 21), de forma a cobrir passivamente os defeitos ósseos preenchidos com os diferentes tipos de tratamento. Para diminuição da tensão e reposicionamento passivo do retalho na sutura, incisões periosteais no lado vestibular foram realizadas.

Figura 21 - Reposicionamento do retalho e sutura com fio absorvível.

Nos períodos pós-operatórios, os cães receberam tratamento periodontal básico (raspagem, polimento e alisamento) e limpeza tópica com digluconato de clorexidina a 0,12% a fim de manter a higiene bucal e evitar contaminação das feridas cirúrgicas.

3.3 MENSURAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS IMPLANTES

A estabilidade dos implantes foi medida por meio da análise de frequência de ressonância do complexo osso-implante, isto é, pela leitura do quociente de estabilidade do implante registrado pelo aparelho Osstell Mentor[®] (Integration Diagnostics AB, Gotemburgo, Suécia) (figuras 22 e 23). Classicamente, quanto maior o valor do quociente de estabilidade do implante (ISQ), maior é a sua estabilidade. A escala de ISQ é formada por valores numéricos de 1 a 100. Segundo dados fornecidos pelo fabricante, os valores de referência são descritos na tabela 1. O aumento ou diminuição substancial na estabilidade do implante pode ser detectado por este método, ao contrário do que quando se realiza apenas uma avaliação clínica. As medidas foram realizadas no momento da instalação dos implantes e no momento da eutanásia dos animais.

Figura 22 - Aparelho Osstell Mentor[®]

Figura 23 - Medição da estabilidade após instalação dos implantes.

Tabela 1 - Valores de referência para o ISQ.

Valor ISQ	Estabilidade
<60	Baixa
61 a 69	Moderada
>70	Alta

3.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Decorrido o período experimental de oito semanas após a cirurgia de instalação dos implantes no segundo lado da mandíbula, os animais foram sacrificados por sobredose anestésica de Thiopentax® (tiopental sódico, Cristal Pharma, Belo Horizonte, MG). Após a eutanásia foram realizados procedimentos para obtenção dos espécimes. Os segmentos das mandíbulas foram removidos, dissecados e posteriormente reduzidos em cinco blocos individuais para cada lado (figura 24). Para redução dos blocos, tomadas radiográficas de cada hemi-mandíbula foram realizadas, com o objetivo de orientar os locais corretos para os cortes.

Figura 24 - Etapas de redução dos espécimes. A) Mandíbula ressecada do animal, B) Hemimandíbula reduzida e posicionada para tomada radiográfica em filme oclusal, C) Radiografia em filme oclusal indicando angulação dos cortes e D) Espécimes reduzidos.

3.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após a remoção, os segmentos ósseos foram fixados em solução de formol 4% tamponado (pH=7) por 48 horas e transferidos para uma solução de etanol, onde permaneceram por três dias. Os espécimes foram desidratados em uma série crescente de álcoois (70%, 80%, 95% e 100%) e incluídos em resina acrílica (LR White[®] Hard Grade, Londres, Inglaterra). O processo de impregnação em resina se deu colocando-se as peças no vácuo e submetendo à agitação de 2 horas por dia, por 15 dias, efetuando-se a substituição por resina limpa a cada 2 dias. Após o processo de impregnação, as peças foram colocadas em estufa a 60°C por 12 horas para que ocorresse a polimerização dos blocos. Depois de polimerizados os blocos, os implantes foram seccionados ao meio, no sentido mesio-distal, utilizando serra de precisão do sistema Exakt[®] (Exakt[®], Apparatebeau, Alemanha) e desgastadas com lixas do sistema Exakt[®] (Exakt[®], Apparatebeau, Alemanha) de granulações 320, 800, 2500 e 4000, até a obtenção de superfície lisa. Os blocos lixados e polidos foram colados a uma lâmina acrílica por meio do sistema Exakt[®] (Exakt[®], Apparatebeau, Alemanha). A superfície exposta da peça colada à lâmina foi novamente lixada e polida até a obtenção de espessura aproximada de 90 µm. Esta face foi então submetida à coloração utilizando a combinação de azul de Stevenel com vermelho de Alizarina.

3.6 ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS

As seguintes medidas histomorfométricas foram realizadas:

1. Contato osso-implante (BIC), em percentual (figura 25);

Figura 25 - Contato osso-implante (BIC): A) Medida do perímetro total, B) Área de osso em contato com a superfície do implante. Magnificação: 10x.

2. Área de osso formada entre as espiras do implante (BA), em percentual (figura 26);

Figura 26 - Área de osso formada entre as espiras do implante (BA): A) Medida da área total entre as espiras, B) Áreas de osso entre as espiras. Magnificação: 10x.

3. Reabsorção da crista óssea com a marcação dos pontos:

- a. IS – Plataforma do implante;
- b. B – Ponto mais coronal de contato osso-implante;
- c. C – Ponto mais alto da crista óssea.

Demarcados os pontos, as seguintes medidas lineares foram realizadas (figura 27):

- a. IS – C: Distância linear entre os pontos IS e C, na distal;
- b. IS – B: Distância linear entre os pontos IS e B, na distal;

Figura 27 - Demarcação dos pontos e medidas lineares da altura da crista óssea remanescente (IS-C) e medida do ponto mais coronal de contato osso-implante (IS-B). Magnificação: 2,5x.

4. Área de osso neoformado, biomaterial remanescente e área de tecido mole em região de interesse (ROI – 2,7 x 4,0 mm) correspondente ao defeito ósseo tratado (figura 28);

Figura 28 - Área do defeito demarcada para quantificação do osso neoformado, biomaterial remanescente e tecido mole. Magnificação: 2,5x.

5. Áreas de tecido epitelial e conjuntivo (figura 29);

Figura 29 - Área de tecido mole recobrindo o defeito: tecido epitelial (em amarelo) e tecido conjuntivo (em vermelho). Notar limite inferior da medida do tecido conjuntivo determinada por linha traçada do topo da crista óssea distal ao implante. Magnificação: 2,5x.

6. Medidas lineares de tecido mole (figura 30):

- a. Distância do topo do implante (TI) à porção mais coronal da mucosa periimplantar (CMP) (TI – CMP);
- b. Distância entre a plataforma do implante (IS) à porção mais coronal da mucosa periimplantar (CMP) (IS – CMP);
- c. Distância entre a porção mais apical da barreira epitelial (ABE) à porção mais coronal da mucosa periimplantar (CMP) (ABE – CMP);
- d. Distância entre a porção mais apical da barreira epitelial (ABE) à porção mais coronal de contato osso-implante (CCO) (ABE – CCO).

Figura 30 - Demarcação dos pontos e medidas lineares de tecido mole. Magnificação: 2,5x.

Para as análises descritas nos itens 1 e 2 foi adotado um aumento de 10x na objetiva. Para as demais análises (itens 3 a 6) uma magnificação de 2,5x foi utilizada. A avaliação foi realizada em microscópio Leika DMLB-2[®] (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) equipado com um sistema de micro vídeo para medidas morfométricas, por meio do software analisador de imagens Leika QWin (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), sem acesso à identificação dos espécimes.

3.7 ANÁLISE MICRO-TOMOGRÁFICA

Os exames micro-tomográficos foram realizados logo após os sacrifícios dos animais, com os espécimes fixados em formaldeído a 4% tamponado (pH=7).

Para aquisição das imagens, foi adotada uma resolução espacial de 12 μm com o microtomógrafo SkyScan® 1172 (SkyScan Ltda., Antuérpia, Bélgica), com ajuste de 50kV de voltagem (figura 31).

Figura 31 - Micro-tomógrafo SkyScan® 1172.

Após aquisição e reconstrução tridimensional das imagens, Volumes de Interesse (VOIs) de 4,0 x 3,0 x 6,0 mm, correspondentes à área dos defeitos, foram determinados. Para tal, foi adotada escala de cinza “threshold” de 55 (máximo) e 30 (mínimo) para avaliação do tecido ósseo e de 80 (máximo) e 55 (mínimo) para avaliação dos biomateriais. Os valores dos parâmetros obtidos com ajuste de escala de cinza para os biomateriais foram subtraídos dos obtidos com ajuste de escala de cinza para tecido ósseo com a finalidade de se eliminar partículas e/ou fragmentos remanescentes de biomaterial dentro do VOI e com isso obter-se o valor real do

tecido ósseo dentro do mesmo. Foram adotados os mesmos ajustes de escala de cinza para as análises micro-tomográficas *in vitro* e *in vivo*.

Foram realizadas análises micro-tomográficas da microarquitetura tridimensional do osso trabecular dos seguintes parâmetros:

- a) Volume total de osso;
- b) Percentual de volume de osso;
- c) Área de Superfície de osso;
- d) Fração de área de superfície óssea e volume total do VOI;
- e) Densidade de área de superfície de osso;
- f) Espessura do trabeculado ósseo;

Um espécime de cada um dos biomateriais utilizados nos experimentos (BB, BC e BG) foram escaneados *in vitro* isoladamente para avaliação dos seguintes parâmetros:

- a) Espessura do trabeculado ósseo;
- b) Número de poros abertos e fechados;
- c) Volume de poros abertos e fechados;
- d) Área de superfície de poros abertos e fechados;
- e) Porosidade de poros abertos e fechados;
- f) Porosidade total.

Para análise *in vitro*, foi adotado um VOI de dimensões idênticas aos da análise dos espécimes (4,0 x 3,0 x 6,0 mm). Os programas DataViewer® versão 1.4.1 (SkyScan Ltda., Antuérpia, Bélgica) e CT Analyser® versão 1.11.8.0 (SkyScan Ltda., Antuérpia, Bélgica) foram utilizados para análise.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Um banco de dados com os resultados foi criado para análise estatística com o auxílio do software estatístico Statistical Package for Social Science para Windows (SPSS®, versão 15,0, IBM®, Nova Iorque, EUA).

Os resultados foram submetidos a teste de normalidade de Shapiro-Wilk, para identificação do tipo de distribuição da amostra de acordo com cada análise utilizada no modelo experimental do presente estudo.

Para os resultados obtidos nas análises de estabilidade dos implantes, BIC, BA, área do defeito, área de tecido mole recobrindo os defeitos, medidas lineares de tecido mole e micro-tomográfica foi utilizada análise de variância (ANOVA) a dois critérios para medidas repetidas nas comparações inter e intragrupos. Já para os dados não paramétricos (análise da reabsorção da crista óssea), foi utilizada a análise de variância de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Tukey.

Os dados foram descritos em gráficos com os parâmetros de médias e desvios padrões. A análise micro-tomográfica *in vitro* dos biomateriais foi descrita em tabela e trouxe resultados de um espécime avaliado para cada biomaterial.

Em todos os testes foi adotado nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Todos os animais suportaram bem os procedimentos cirúrgicos. As três intervenções foram realizadas sem intercorrências. No período experimental, dois animais foram excluídos da amostra e sacrificados, ambos por doença que impossibilitava que permanecessem no protocolo de pesquisa. Dois novos animais foram adicionados e os espécimes obtidos foram devidamente incluídos na amostra final depois de terminados os tempos experimentais e respectivas análises.

Durante o tempo do protocolo experimental, quatro implantes foram perdidos: um do grupo tratado com BB em 16 semanas com membrana, um do BB em 16 semanas sem membrana, um do BC em 8 semanas sem membrana e um do Ab em 8 semanas sem membrana. No total, a amostra constituiu-se de 116 sítios de implantes tratados com os diferentes biomateriais propostos.

4.1 ESTABILIDADE DOS IMPLANTES

As medidas da frequência de ressonância obtidas no momento da instalação dos implantes e da eutanásia mostraram aumento da estabilidade em todos os grupos da medida inicial à final, em 8 e 16 semanas. Em todos os tratamentos com ou sem membrana, os valores de ISQ Final foram superiores aos obtidos inicialmente;

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes na comparação intergrupos dos valores de RFA Final em 8 e 16 semanas ($p < 0,05$) (gráfico 1). Quando a membrana não foi utilizada, os valores de ISQ final dos implantes em sítios tratados com Ab e Cg mostraram-se similares entre si e superiores aos demais tratamentos em 8 semanas. Dentre os biomateriais o BB e BC apresentaram-se semelhantes e superiores ao BG (8 semanas). No período de 16 semanas, o ISQ final dos implantes em sítios tratados com BC apresentou resultados superiores ao Ab e demais tratamentos. Quando a membrana foi utilizada, os valores de ISQ final dos implantes em sítios

tratados com BC foram superiores aos demais tratamentos (8 semanas). No período de 16 semanas, o BC mostrou-se similar ao BG e superior aos outros tratamentos. O Cg foi ligeiramente superior ao Ab ($p<0,05$).

O uso de membranas recobrimdo os defeitos aparentemente não proporcionou maior estabilidade final aos implantes nos dois períodos avaliados (8 e 16 semanas).

Gráfico 1 - Médias e desvios padrões dos valores de ISQ iniciais e finais obtidos nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *= Diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p<0,05$).

4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise histológica demonstrou que todos os implantes apresentaram bom padrão de osseointegração. Em todos os defeitos foi constatada presença de neoformação óssea em graus variáveis de acordo com o grupo avaliado. Focos de osteogênese à distância, a partir das paredes posterior e apical do defeito foram observados com frequência em todos os sítios. Restritas regiões de osteogênese de contato também estiveram presentes (figura 32). Os focos de neoformação apresentaram-se constantemente como osso imaturo e escassas regiões de osso lamelar no período de reparo de 8 semanas. No tempo de 16 semanas, maior presença

de osso lamelar foi constatada, porém ainda com predominância de osso imaturo (figura 33).

Figura 32 - Formação de novo osso a partir da superfície do implante demonstrando processo de osteogênese de contato. NO=novo osso; Magnificação: 10x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Figura 33 - Formação de osso imaturo e osso lamelar no interior do defeito visualizados: A) Por luz transmitida; B) Por luz polarizada. Notar áreas desorganizadas/escurecidas evidenciando osso imaturo (OI) e organizadas/claras – osso lamelar (OL); Magnificação: 10x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

O completo reparo do defeito não foi observado em nenhum dos tratamentos avaliados, independente do tempo experimental ou uso de membrana de colágeno. No limite ósseo superior do defeito uma faixa de osso imaturo pôde ser visualizada nos sítios tratados com Ab e Cg, logo abaixo do epitélio e tecido conjuntivo que o recobria (figura 34). Já nos defeitos tratados com BC e BG, algumas partículas residuais de biomaterial interpostas a osso imaturo puderam ser encontradas (figura 35). Nos sítios tratados com BB havia predomínio do arcabouço do biomaterial em contato direto com o tecido conjuntivo, com escassos focos de osso imaturo depositados em sua superfície (figura 36). A maior presença de infiltrado inflamatório e de tecido conjuntivo foi vista nos sítios onde não foi utilizado o recobrimento com membrana de colágeno nos dois tempos experimentais (8 e 16 semanas). A presença de células adiposas em quantidade similar também foi constatada.

Figura 34 - Aspecto histológico do teto do defeito em contato com o tecido conjuntivo (setas). Notar predominância de osso imaturo. Magnificação: 2,5x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Figura 35 - Aspecto histológico do teto do defeito em contato com o tecido conjuntivo (setas). Notar partículas de biomaterial interpostas a osso imaturo. Magnificação: 2,5x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Figura 36 - Aspecto histológico do teto do defeito em contato com o tecido conjuntivo (setas). Notar predominância do BB com escassos focos de osso imaturo; B=biomaterial, NO=novo osso; Magnificação: 2,5x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Pequenos fragmentos de membrana de colágeno (BGd) utilizada para recobrimento dos defeitos em metade dos sítios puderam ser visualizados de maneira discreta no período de 8 semanas, não sendo possível no período mais tardio (16 semanas). O tecido epitelial e conjuntivo que recobria os defeitos apresentou-se com espessura variável dentre os sítios avaliados.

Biomaterial residual de BB, BC e BG foi observado em todos os sítios tratados, em diferentes quantidades. O BB foi menos reabsorvido em comparação ao BC e BG, preservando-se a maior parte de sua estrutura trabecular macro e micro-porosa na área do defeito com escasso preenchimento de osso nestes espaços vazios. Partículas residuais de biomateriais apresentavam-se, com frequência, envoltas por osso imaturo e/ou lamelar (figura 37) e com menor frequência imersas em tecido conjuntivo, além de trincas esporádicas em sua estrutura (figura 38) e pequenos focos de atividade osteoclástica em sua superfície (figura 39). Não foram observadas partículas remanescentes de biomaterial em contato direto com a superfície do implante em nenhum dos tratamentos e tempos experimentais avaliados. Menor quantidade de osso depositado sobre a estrutura do biomaterial foi constatada nos sítios tratados com BB (figura 40) em comparação com o BC e BG, independente do tempo experimental avaliado ou o uso de membrana.

Figura 37 - Aspecto histológico das partículas residuais de biomaterial envoltas por osso imaturo (A e B). Setas indicam presença de linhas de osteoblastos realizando formação de novo osso; B=biomaterial, NO=novo osso; Magnificação: 20x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Figura 38 - Partícula de biomaterial (B) envolvida por novo osso (NO). Notar presença de trinca na superfície do biomaterial. Magnificação: 20x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Figura 39 - Corte histológico evidenciando presença de células gigantes multinucleadas - osteoclastos na superfície do biomaterial (setas); B=biomaterial, NO=novo osso; Magnificação: 20x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Figura 40 - Aspecto histológico de escassas áreas de formação óssea na superfície do BB; B=biomaterial, NO=novo osso; Magnificação: 20x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Os aspectos histológicos dos defeitos em seus respectivos tratamentos e tempos experimentais são exemplificados nas figuras 41 a 50.

Figura 41 - Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com Ab no tempo experimental de 8 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Figura 42 - Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com Ab no tempo experimental de 16 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Figura 43 - Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com Cg no tempo experimental de 8 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Figura 44 - Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com Cg no tempo experimental de 16 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Figura 45 - Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com BB no tempo experimental de 8 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Figura 46 - Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com BB no tempo experimental de 16 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Figura 47 - Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com BC no tempo experimental de 8 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Figura 48 - Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com BC no tempo experimental de 16 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Figura 49 - Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com BG no tempo experimental de 8 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

Figura 50 - Cortes histológicos méso-distais dos defeitos tratados com BG no tempo experimental de 16 semanas. A) Sem o recobrimento da membrana, B) Com recobrimento da membrana. Magnificação: 1,6x; Coloração: azul de Stevenel + vermelho de alizarina.

4.3 CONTATO OSSO-IMPLANTE (BIC)

O contato osso-implante (BIC) foi avaliado na área do defeito e em toda a extensão do implante. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas comparações inter e intragrupos ($p > 0,05$). Quando não se utilizou membrana, o Ab apresentou maiores valores de BIC no interior do defeito e BIC total em 8 e 16 semanas em relação aos demais tratamentos. Dentre os biomateriais testados, o BB foi o que mostrou melhor desempenho no BIC defeito em 8 semanas e o BC em 16 semanas, o qual obteve o maior BIC total (8 e 16 semanas). Na utilização da membrana, o BG, Ab e Cg demonstraram desempenho semelhante em 8 e 16 semanas nos valores de BIC no interior do defeito e total e superior ao BB e BC ($p > 0,05$). Os resultados supracitados podem ser visualizados no gráfico 2.

Gráfico 2 - Médias e desvios padrões dos percentuais de contato osso-implante (BIC) no defeito e total nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p>0,05$).

4.4 ÁREA DE OSSO FORMADA ENTRE AS ESPIRAS DO IMPLANTE (BA)

A área de osso formada entre as espiras do implante (BA) foi analisada na área do defeito e em toda a extensão do implante. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na comparação inter e intragrupos ($p>0,05$). Na não utilização de membrana, o BC e em grânulos apresentaram valores de BA no defeito semelhantes ao Ab e Cg em 8 semanas e inferiores ao Ab em 16 semanas. O BB apresentou o pior desempenho dentre estes tratamentos nos dois tempos experimentais avaliados ($p>0,05$). Já o BA total apresentou resultados próximos para todos os tratamentos, com maior valor do Cg em 16 semanas ($p>0,05$). Quando a membrana foi usada para recobrir os defeitos, o Cg demonstrou valores superiores em comparação aos demais tratamentos no BA no defeito (8 e 16 semanas). O BG e o Ab obtiveram resultados similares no BA no defeito em 8 e 16 semanas. Novamente o BB apresentou o pior desempenho de BA no defeito dentre todos os grupos experimentais ($p>0,05$). Com relação ao BA total, o Ab e Cg mostraram-se superiores aos demais

tratamentos. O BG obteve o melhor desempenho dentre os biomateriais utilizados em 8 semanas e o BC em 16 semanas ($p>0,05$). Os valores estão detalhados no gráfico 3.

Gráfico 3 - Percentual de área de osso entre as espiras (BA) no defeito e total obtidos nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p>0,05$).

4.5 REABSORÇÃO DA CRISTA ÓSSEA

As medidas lineares do ombro do implante ao topo da crista óssea distal (IS-C) revelaram menor perda de altura vertical nos sítios tratados com BB, independentemente do uso da membrana, tanto em 8 quanto em 16 semanas ($p<0,05$). Quando a membrana não foi utilizada, os valores de IS-C do BG foram similares ao BB em 16 semanas ($p<0,05$). Na utilização da membrana, os valores de IS-C do BC foram próximos ao BB em 8 e 16 semanas ($p<0,05$). Todos os biomateriais utilizados apresentaram desempenho superior ao Ab na maior preservação da crista óssea distal com ou sem membrana em 8 e 16 semanas ($p<0,05$). O uso da membrana

parece não ter favorecido a maior preservação da crista óssea nos dois períodos experimentais avaliados (8 e 16 semanas).

Com relação à medida linear do ombro do implante ao primeiro ponto de contato do osso com a superfície do implante (IS-B) observou-se contato ósseo mais alto nos sítios tratados com BG em comparação aos demais tratamentos, seguido do BB (sem membrana, 8 e 16 semanas). Quando a membrana foi utilizada, o BB demonstrou melhor desempenho em 8 e 16 semanas, seguido do BG ($p<0,05$).

Os valores descritos acima podem ser observados no gráfico 4.

Gráfico 4 - Médias e desvios padrões das medidas lineares IS-B e IS-C de reabsorção da crista óssea distal nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *=Diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos. Análise de Kruskal-Wallis com teste *post hoc* de Tukey ($p<0,05$).

4.6 ANÁLISE DA ÁREA DO DEFEITO

Para análise da área do defeito, delimitou-se uma Região de Interesse (ROI) que correspondia à área do defeito ósseo. Dentro deste ROI, analisaram-se três parâmetros distintos: área de formação óssea, de biomaterial remanescente e de presença de tecido mole. Na análise da área de osso formado no interior do ROI, foi observada diferença

estatisticamente significativa nas comparações entre os tratamentos testados ($p < 0,05$). O Ab apresentou melhor formação óssea em 8 e 16 semanas (sem membrana) e em 8 semanas (com membrana). A maior área de formação óssea foi obtida no Cg com membrana em 16 semanas. Quando não utilizada membrana, entre os sítios tratados com os biomateriais, o BB apresentou o pior desempenho na formação óssea (8 e 16 semanas). O BC demonstrou formação óssea semelhante ao Ab (8 semanas) decaindo em 16 semanas. O BG proporcionou a melhor formação óssea entre os biomateriais (16 semanas). Quando a membrana recobriu os defeitos, o BB também obteve o pior desempenho na formação óssea em 8 semanas e resultados equivalentes ao BC em 16 semanas. O BC apresentou a melhor formação óssea entre os biomateriais em 8 e 16 semanas. O uso da membrana melhorou a formação óssea em todos os tratamentos em 16 semanas. Os valores descritos acima podem ser observados no gráfico 5.

Gráfico 5 - Médias e desvios padrões dos valores de área de formação óssea na região de interesse delimitada no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *=diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p < 0,05$).

Analisando-se a área de biomaterial remanescente na ROI, foi observada diferença estatisticamente significativa nas comparações intergrupos em 8 e 16 semanas, com e sem o uso da membrana recobrindo os defeitos ($p<0,05$). O BB apresentou maior quantidade de biomaterial remanescente em 8 e 16 semanas, com e sem o uso da membrana. Já o BC e BG demonstraram quantidade remanescente semelhante em 8 e 16 semanas com e sem membrana e menores que o BB ($p<0,05$). Todos os biomateriais reabsorveram parcialmente de 8 para 16 semanas. Os resultados estão detalhados no gráfico 6.

Gráfico 6 - Médias e desvios padrões dos valores de área de biomaterial remanescente na região de interesse delimitada no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *=diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p<0,05$).

Com relação à presença de tecido mole na ROI, foi observada diferença estatisticamente significativa nas comparações intergrupos em 8 e 16 semanas, com e sem o uso da membrana recobrindo os defeitos ($p<0,05$). Quando não utilizada membrana, a presença de tecido mole no interior do defeito aumentou do período de 8 ao de 16 semanas para todos os tratamentos. Uma relação inversa foi observada nos defeitos recobertos por membrana. A quantidade de tecido mole diminuiu do período

de 8 ao de 16 semanas em todos os tratamentos. Todos os grupos experimentais apresentaram equivalente presença de tecido mole no interior do defeito (gráfico 7).

Gráfico 7 - Médias e desvios padrões dos valores de área de tecido mole presente na região de interesse delimitada no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *=diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p < 0,05$).

4.7 ÁREA DE TECIDO MOLE RECOBRINDO O DEFEITO

Todos os sítios avaliados no presente estudo foram reparados com o implante em condições não submersas. Os valores percentuais de área de tecido epitelial e conjuntivo que recobriram os defeitos ósseos estão demonstrados no gráfico 8. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas comparações inter e intragrupos ($p > 0,05$). Os percentuais de área de tecido epitelial e conjuntivo pouco variaram de acordo com os diferentes tratamentos testados nos dois tempos experimentais (8 e 16 semanas) (gráfico 8).

Gráfico 8 - Médias dos valores de percentual de área de tecido epitelial e conjuntivo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p>0,05$).

4.8 MEDIDAS LINEARES DE TECIDO MOLE

Avaliando-se a medida de distância linear do topo do implante ao ponto mais coronal da mucosa periimplantar (TI-CMP), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas comparações inter e intragrupos ($p>0,05$). Quando a membrana não foi utilizada, o BB apresentou maior distância em 8 semanas e o menor valor em 16 semanas ($p>0,05$). Os demais tratamentos demonstraram similar desempenho em 8 e 16 semanas. Na utilização da membrana, o Ab obteve os menores e o Cg os maiores valores em 8 semanas. Em 16 semanas, os tratamentos mostraram-se similares entre si ($p>0,05$). Os resultados descritos podem ser vistos no gráfico 9:

Gráfico 9 - Médias dos valores da distância linear do topo do implante ao ponto mais coronal da mucosa periimplantar (TI-CMP) nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p>0,05$).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas comparações inter e intragrupos dos valores de distância entre o ombro do implante e o ponto mais coronal da mucosa periimplantar (IS-CMP) ($p>0,05$). Dos tratamentos testados, o Ab foi o que obteve menores valores em 16 semanas, com ou sem membrana recobrindo os defeitos. De modo geral, os tratamentos mostraram-se com valores bem semelhantes em 8 e 16 semanas, independente do uso de membrana ($p>0,05$).

A medida linear da distância entre o ponto mais apical da barreira epitelial e o ponto mais coronal da mucosa periimplantar (ABE-CMP) demonstrou que todos os sítios tratados foram inferiores ao Ab em 8 semanas sem membrana. Dentre os biomateriais, o BC obteve maiores valores ($p>0,05$). Já em 16 semanas sem a utilização da membrana, o Ab demonstrou a maior e o Cg a menor espessura de tecido epitelial entre os tratamentos. Quando do uso da membrana recobrindo os defeitos, todos os tratamentos apresentaram comportamentos semelhantes, com exceção do Cg em 16 semanas que obteve o maior valor dentre todos os grupos experimentais testados ($p>0,05$) (gráfico 10).

Gráfico 10 - Médias dos valores de distância linear do ponto mais apical da barreira epitelial ao ponto mais coronal da mucosa periimplantar (ABE-CMP) nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p>0,05$).

Analisando a medida linear da distância do ponto mais apical da barreira epitelial e o ponto mais coronal de contato osso-implante (ABE-CCO), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas comparações inter e intragrupos ($p>0,05$). Em geral, todos os tratamentos apresentaram resultados similares de vedamento de tecido conjuntivo, com espessura mínima de 2,5 mm de tecido para todos os grupos.

4.9 ANÁLISE MICRO-TOMOGRÁFICA

Um total de 60 espécimes foram escaneados e analisados, correspondente a 3 amostras para cada tipo de tratamento em cada um dos tempos experimentais, com e sem a utilização de membrana recobrimdo os defeitos (figuras 51 a 55).

Figura 51 - Reconstruções 3D dos espécimes e VOIs de defeitos tratados com Ab: A e B) 8 semanas sem membrana; C e D) 16 semanas sem membrana; E e F) 8 semanas com membrana; G e H) 16 semanas com membrana.

Figura 52 - Reconstruções 3D dos espécimes e VOIs de defeitos tratados com Cg: A e B) 8 semanas sem membrana; C e D) 16 semanas sem membrana; E e F) 8 semanas com membrana; G e H) 16 semanas com membrana.

Figura 53 - Reconstruções 3D dos espécimes e VOIs de defeitos tratados com BB: A e B) 8 semanas sem membrana; C e D) 16 semanas sem membrana; E e F) 8 semanas com membrana; G e H) 16 semanas com membrana. Notar presença de biomaterial remanescente em amarelo.

Figura 54 - Reconstruções 3D dos espécimes e VOIs de defeitos tratados com BC: A e B) 8 semanas sem membrana; C e D) 16 semanas sem membrana; E e F) 8 semanas com membrana; G e H) 16 semanas com membrana. Notar presença de biomaterial remanescente em amarelo.

Figura 55 - Reconstruções 3D dos espécimes e VOIs de defeitos tratados com BG: A e B) 8 semanas sem membrana; C e D) 16 semanas sem membrana; E e F) 8 semanas com membrana; G e H) 16 semanas com membrana. Notar presença de biomaterial remanescente em amarelo.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa nas comparações intra e intergrupos ($p > 0,05$) no que diz respeito ao volume total de osso dentro do VOI (gráfico 11). Quando não se utilizou membrana para recobrir os defeitos, o BG proporcionou o maior volume total de osso em 8 semanas e inferior apenas ao Ab em 16 semanas ($p > 0,05$). Na utilização da membrana, o Ab proporcionou maior volume total de osso em 8 semanas. Dentre os biomateriais, o BG obteve maior volume total de osso em 8 semanas. O BB apresentou o pior desempenho entre todos os tratamentos, em 8 e 16 semanas, com ou sem o uso de membrana ($p > 0,05$).

Gráfico 11 - Médias e desvios padrões dos valores de volume total de osso obtidas no VOI delimitado no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p>0,05$).

Com relação ao parâmetro percentual de volume de osso (gráfico 12), o BG apresentou maiores valores que os demais tipos de tratamento em 8 semanas. Em 16 semanas, o mesmo obteve o melhor desempenho dentre os biomateriais sendo inferior ao Ab e Cg quando não utilizada membrana para recobrir os defeitos. Já na utilização da membrana, o BG novamente foi o melhor biomaterial em 8 semanas, sendo inferior apenas ao Ab. O BB foi o tratamento de pior desempenho, independente do tempo experimental ou uso de membrana. Porém, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas comparações intra e intergrupos nos resultados descritos acima ($p>0,05$).

Gráfico 12 - Médias e desvios padrões dos valores de percentual de volume de osso obtidas no VOI delimitado no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p > 0,05$).

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas comparações intergrupos no que diz respeito ao parâmetro área de superfície de osso ($p < 0,05$) (gráfico 13). O BG apresentou maiores valores de área de superfície óssea entre todos os tratamentos quando a membrana não foi utilizada (8 e 16 semanas) e melhor biomaterial com membrana (8 semanas). O Ab apresentou maior área de superfície de osso (8 semanas com membrana). O BC foi o tratamento de melhor desempenho com membrana em 16 semanas, seguido do BG ($p < 0,05$).

Gráfico 13 - Médias e desvios padrões dos valores de área de superfície de osso obtidas no VOI delimitado no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *=diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p < 0,05$).

A análise do parâmetro área de superfície/volume de osso (gráfico 14) revelou maiores valores do BC em 8 semanas sem membrana e em 8 e 16 semanas com membrana. O BB demonstrou o pior desempenho entre os biomateriais em 8 e 16 semanas sem membrana. O Cg apresentou os menores valores em 16 semanas (com membrana). Os três biomateriais obtiveram resultados superiores ao Ab e Cg em 8 e 16 semanas quando recobertos por membrana de colágeno. Os resultados descritos acima foram estatisticamente significantes nas comparações intergrupos ($p < 0,05$).

Gráfico 14 - Médias e desvios padrões dos valores de área de superfície óssea por volume de osso obtidas no VOI delimitado no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *=diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p < 0,05$).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas comparações intra e intergrupos na análise do parâmetro densidade de área de superfície de osso ($p > 0,05$). Quando não utilizada membrana, o BG obteve maiores valores de densidade de área de superfície em 8 e 16 semanas, seguido do BC (8 semanas) e BB (16 semanas). Já quando recobertos por membrana, o Ab apresentou a maior densidade em 8 semanas. Dentre os biomateriais, o BG obteve os maiores valores em 8 semanas e o BC, que em 16 semanas demonstrou a maior densidade de área de superfície de osso de todos os tratamentos ($p > 0,05$) (gráfico 15).

Gráfico 15 - Médias e desvios padrões dos valores de densidade de área de superfície de osso obtidas no VOI delimitado no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p > 0,05$).

A análise do parâmetro espessura do trabeculado ósseo demonstrou diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos ($p < 0,05$). Quando não utilizada membrana, o BC apresentou maior espessura de trabeculado (8 semanas) e o Ab a maior em 16 semanas. Na utilização de membrana, o Ab e Cg obtiveram as maiores espessuras de trabeculado ósseo (8 e 16 semanas). Dentre os biomateriais, o BC e BG mostraram-se similares em 8 semanas e o BG demonstrou maior espessura em 16 semanas (gráfico 16).

Gráfico 16 - Médias e desvios padrões dos valores de espessura do trabeculado ósseo obtidas no VOI delimitado no defeito ósseo nos tempos de 8 e 16 semanas de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *=diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($p < 0,05$).

4.10 ANÁLISE MICRO-TOMOGRÁFICA *IN VITRO* DOS BIOMATERIAIS

A análise *in vitro* dos biomateriais (figuras 56, 57 e 58) foi realizada adotando-se um VOI de dimensões idênticas às utilizadas para os espécimes. O BB apresentou maior espessura de trabeculado, volume e porosidade de poros abertos e porosidade total. Já o BG mostrou-se com maior número, volume e área de superfície de poros fechados. O BC se manteve com valores intermediários comparando-se com os demais em todos os parâmetros avaliados (tabela 2).

Figura 56 - Reconstrução 3D de amostra de BB escaneada *in vitro*: A) Vista lateral, B) Vista lateral com transparência, C) Vista superior.

Figura 57 - Reconstrução 3D de amostra de BC escaneada *in vitro*: A) Vista lateral, B) Vista lateral com transparência, C) Vista superior.

Figura 58 - Reconstrução 3D de amostra de BG escaneada *in vitro*: A) Vista lateral, B) Vista lateral com transparência, C) Vista superior.

Tabela 2 - Distribuição dos parâmetros micro-tomográficos dos biomateriais *in vitro*.

Parâmetros	Unidade	Biomaterial		
		Bio-Oss Block®	Bio-Oss Collagen®	Bio-Oss® grânulos
Espessura do trabeculado	mm	0,12	0,05	0,03
Poros fechados:				
Número	-	58.490	451.807	731.256
Volume	mm ³	0,02	0,22	0,52
Área de superfície	mm ²	14,67	144,02	312,64
Porosidade	%	0,17	0,98	2,17
Poros abertos:				
Volume	mm ³	37,05	27,06	25,66
Porosidade	%	74,19	54,18	51,38
Porosidade total	%	74,24	54,63	52,44

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O presente estudo comparou os resultados obtidos com a utilização de biomateriais de diferentes porosidades no tratamento de defeitos ósseos cervicais de 2,7 mm ao redor de implantes, além de avaliar a influência do emprego da técnica de regeneração óssea guiada em dois tempos experimentais distintos (8 e 16 semanas). Foram utilizadas análises de histologia, histomorfometria, frequência de ressonância e micro-tomografia visando investigar a influência das diferentes porosidades *in vitro* de biomateriais na resposta biológica *in vivo*. Não há relatos prévios na literatura do uso de biomateriais porosos em bloco em modelos experimentais de defeitos circunferenciais ao redor de implantes osseointegráveis, da utilização da variedade de parâmetros empregados para analisar o comportamento biológico *in vivo* de biomateriais porosos e da comparação entre si e com outros tratamentos em um mesmo animal.

O emprego do RFA tem sido amplamente utilizado na literatura para aferição objetiva, não invasiva, não destrutiva e medida precisa da estabilidade de implantes. O referido método tem sido validado por estudos clínicos randomizados controlados e de coorte (APARICIO et al., 2006). A análise da estabilidade dos implantes revelou diferenças estatisticamente significantes nas comparações intergrupos para os valores de ISQ finais ($p < 0,05$). Nos valores de ISQ iniciais por sua vez, não foram identificadas diferenças significantes nas comparações intra e intergrupos ($p > 0,05$). Tem sido relatado que implantes com baixos valores de ISQ proporcionaram acréscimos mais marcantes nos valores com o decorrer do tempo se comparados a implantes que já apresentavam alto ISQ no momento de sua instalação (BAREWAL et al., 2003; OLSSON et al., 2003; SJÖSTRÖM et al., 2005), demonstrando a sensibilidade do método às mudanças ocorridas na interface osso/implante durante o período de osseointegração (MEREDITH et al., 1997a, 1997b; NKENKE et al., 2005; WEST e OATES, 2007; HUWILER et al., 2007; KUNNEKEL et al., 2011). Em todos os tratamentos testados no presente estudo, os valores de ISQ aumentaram da medida inicial à final e do período de 8 ao de 16 semanas, independentemente do uso de membrana recobrindo os defeitos. Os

implantes instalados em defeitos tratados com BC apresentaram maiores valores de ISQ final que os demais tipos de tratamento em 16 semanas sem membrana e em 8 e 16 semanas com membrana ($p < 0,05$). Pôde ser constatado nas análises do presente estudo que o referido biomaterial apresentou bom padrão de formação óssea na área do defeito, o que explicaria a boa estabilidade dos implantes nos sítios em que foi utilizado.

O reparo de alvéolos pós-extração inclui uma série de eventos biológicos que ocorrem a partir da formação e maturação do coágulo com subsequente substituição por matriz provisória e osso imaturo (LIN et al., 1994). Para que este processo ocorra de maneira mais rápida e eficiente, minimizando assim o remodelamento e alteração das dimensões anatômicas do alvéolo em questão, diferentes tipos de biomaterial ou mesmo osso autógeno são utilizados para obtenção do reparo ósseo desejado. Quando adicionadas, parte das partículas de enxerto xenogênico participa ativamente do processo de reparo enquanto outras são lentamente envolvidas por uma mistura de osso imaturo e lamelar e se tornam inertes (ARAÚJO et al., 2008). No presente estudo, foram observadas partículas de biomaterial envoltas por osso lamelar e/ou imaturo, e algumas imersas em tecido conjuntivo. Nenhum biomaterial foi localizado em contato direto com a superfície do implante nos dois tempos experimentais avaliados. A ausência de biomaterial em contato com o implante foi relatada em estudos em animais (BERGLUNDH & LINDHE, 1997; HÄMMERLE et al. 1998; BOTTICELLI et al., 2004; SIVOLELLA et al., 2013). Um indício importante da ativa participação das três formas de Bio-Oss® em nosso estudo no processo de reparo foi a presença de células gigantes multinucleadas - osteoclastos - em sua superfície, sugerindo atividade de remodelamento e sua gradual eliminação. Este achado corrobora com o que foi constatado em outros estudos (HÜRZELER et al., 1997; HÄMMERLE et al., 1998; ARAÚJO et al., 2001; ZITZMANN et al., 2001; CARDAROPOLI et al., 2005).

Os defeitos tratados com o BB apresentaram predomínio do arca-bouço do biomaterial em contato direto com o tecido conjuntivo, conferindo maior manutenção de volume, mas com escassos focos de osso imaturo depositados em sua superfície. Relatos semelhantes a este padrão de reparo também foram observados em estudos que utilizaram este biomaterial em diferentes modelos experimentais (ARAÚJO et al.,

2002; DE SANTIS et al., 2011). É descrito na literatura que o padrão de formação óssea no interior dos defeitos se dá predominantemente por processo de osteogênese à distância, iniciando em maior proporção na sua região mais apical e depois nas paredes laterais (AMLER, 1969; CARDAROPOLI et al., 2005; ROSSI et al., 2011). Este padrão pôde ser comprovado na análise histológica dos defeitos do presente estudo.

Por definição, o processo de osseointegração de implantes ocorre quando há contato direto entre o osso e a superfície do implante à observação em microscopia de luz (ALBREKTSSON et al., 1981). A quantificação deste contato é, portanto, um importante parâmetro para determinar a interação com o tecido ósseo. No presente estudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre valores de BIC nas comparações intra e intergrupos ($p>0,05$). Os defeitos tratados com BB apresentaram o melhor BIC entre os biomateriais testados em 8 semanas quando não foi utilizado recobrimento com membrana. Estes resultados contradizem os encontrados no estudo de De Santis et al. (2011), em modelo experimental que avaliou a integração de implantes instalados em sítios aumentados horizontalmente com BB ou Ab. Os autores encontraram valor médio de BIC de 5,8% para o BB e valor consideravelmente superior para o Ab (56,7%), após 3 meses de reparo. Adicionalmente, relataram a ausência de osseointegração dos implantes apesar de aparentemente estáveis nos sítios tratados. Em nosso estudo o BG obteve resultados semelhantes ao Ab e Cg quando a membrana foi utilizada nos dois períodos avaliados (8 e 16 semanas) ($p>0,05$). A literatura sobre a eficácia deste material em relação ao BIC é controversa. Enquanto modelos experimentais semelhantes suportam estes achados (BERLUNDH e LINDHE, 1997; POLYZOIS et al., 2007; ABUSHAHBA et al., 2008; CANEVA et al., 2012), outros autores demonstram que a presença no interior do “gap” proporcionou menor BIC, comparado ao Ab e Cg, independentemente do uso de membranas (CARMAGNOLA et al., 2000; BOTTICELLI et al., 2004; ANTUNES et al., 2013; SIVOLELLA et al., 2013). Tais divergências podem ser interpretadas pelas diferenças nas dimensões estabelecidas na confecção dos defeitos ósseos e dos tempos de avaliação adotados em cada modelo experimental. No presente estudo, o período mais tardio de análise foi de 16 semanas. O BC foi o biomaterial que proporcionou os maiores valores de BIC sem o uso da membrana. Resultados favoráveis quanto ao uso do BC também

foram observados por Araújo e colaboradores (2011). Avaliando a influência da colocação do mesmo em defeitos vestibulares após implantes imediatos em cães após período de 6 meses, constataram presença de formação óssea adicional no topo do alvéolo e melhora no nível marginal do contato osso-implante.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas comparações inter e intragrupos no que diz respeito à análise da área de osso formada entre as espiras do implante (BA) ($p>0,05$). Os defeitos tratados com Cg apresentaram valores superiores aos demais tratamentos, tanto em 8 ou em 16 semanas, quando a membrana foi utilizada. Achados semelhantes foram observados em estudo prévio conduzido pelo nosso grupo (ANTUNES et al., 2013). Em modelo experimental utilizando defeitos circunferenciais na região cervical dos implantes sem o recobrimento de membrana, o Cg obteve maiores valores de BA que os demais tratamentos. Creditou-se o achado à presença de partículas de biomaterial interpostas à superfície dos implantes e às dimensões do defeito adotadas no modelo experimental (1,5 mm). No presente trabalho, foram utilizados defeitos de dimensões maiores (2,7 mm) que segundo Polyzois et al. (2007) e Ferrus et al. (2010) seriam supostamente mais favoráveis para formação óssea quando no uso de biomateriais. Este fato não foi observado em nossos resultados. O BB obteve o pior desempenho de todos os tratamentos no que diz respeito ao BA, nos dois períodos testados, independente do uso da membrana. Esse desempenho pode ser justificado pela menor quantidade de osso formada nos defeitos tratados por este biomaterial quando toda a área do defeito foi avaliada, demonstrando um padrão geral de formação óssea deficiente e não só na região entre as espiras do implante. Já o BC e BG apresentaram resultados de BA semelhantes ao Ab em 8 semanas quando a membrana não foi utilizada, porém, inferiores no período mais tardio (16 semanas). O BG mostrou-se similar ao Ab em 8 semanas (com membrana). Estes resultados corroboram com os encontrados por Abushahba et al. (2008), no qual os valores de BA em sítios tratados com o referido material foram equivalentes ao Ab e Cg após 3 meses.

As alterações dimensionais no alvéolo pós-extração são consideradas o problema mais crítico na aplicação da técnica de implantes imediatos. O intenso remodelamento que ocorre após extração dental proporciona efeitos indesejáveis com

consequências estéticas e funcionais negativas, que colocam em risco o sucesso do tratamento reabilitador com implantes osseointegráveis. Geralmente, as dimensões do alvéolo são maiores que as do implante, resultando em defeito ósseo em sua região cervical (“gap”), que é apontado como um dos fatores responsáveis por esta perda óssea vertical e horizontal (CARMAGNOLA et al., 2003). Além disso, a instalação do implante em si não evita que este processo ocorra (ARAÚJO et al., 2005; CANEVA et al., 2010d).

No intuito de explicar a severa perda óssea especialmente da tábua vestibular, Araújo e Lindhe (2005) identificaram uma área de tecido ósseo revestindo o alvéolo a qual denominaram de “bundle bone”. Trata-se de uma camada fina de tecido ósseo ricamente vascularizado em que as fibras do ligamento periodontal se inserem diretamente, sendo considerada parte do periodonto de inserção. Uma vez extraído o elemento dental, esta camada de osso entra em processo de reabsorção, que ocorre mais rapidamente que as demais estruturas ósseas do alvéolo. Segundo os autores, a tábua óssea vestibular possuiria uma camada mais espessa de “bundle bone”, o que explicaria sua reabsorção mais severa em relação à lingual.

Inúmeros estudos têm sido conduzidos visando minimizar os efeitos deletérios deste processo de remodelamento modificando-se alguma etapa do protocolo de tratamento. O uso do princípio de regeneração óssea guiada (CANEVA et al., 2010a), abordagens imediata ou tardia (ANTUNES et al., 2013), simulação de defeitos de diferentes dimensões (POLYZOIS et al., 2007), instalação de implantes com diferentes tamanhos e configurações (CANEVA et al., 2010b; BRESSAN et al., 2012; BAFFONE et al., 2011), com ou sem a utilização de retalho mucoperiosteal (CANEVA et al., 2010c), uso de enxerto livre de tecido conjuntivo recobrindo o alvéolo (CANEVA et al., 2013), de biomateriais para preenchimento do defeito (BOTTICELLI et al., 2004), sobrecorreção do defeito com biomaterial (FICKL et al., 2009), diferentes posicionamentos dos implantes no alvéolo (CANEVA et al., 2010d), e preservação ou não das fibras remanescentes do ligamento periodontal (CARDAROPOLI et al., 2005) foram testados sem êxito na maior preservação das dimensões das paredes do alvéolo.

No presente estudo, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nas comparações intergrupos dos valores de IS-C ($p < 0,05$). O BB foi o

tratamento que conferiu menor perda óssea vertical distal nos dois tempos experimentais avaliados (8 e 16 semanas), independente do uso de membrana recobrimo os defeitos ($p<0,05$). Este achado também foi sugerido no trabalho de Faria et al. (2010), que utilizou material em bloco poroso à base de titânio em defeitos ósseos cirurgicamente criados. Contrariamente, De Santis et al. (2012), em estudo que comparou implantes instalados em sítios previamente aumentados com BB ou Ab em bloco, revelaram extensa reabsorção em altura nas cristas ósseas enxertadas com o referido biomaterial. Alguns trabalhos ressaltam os benefícios trazidos pela colocação do BC e BG em minimizar os efeitos da remodelação da crista óssea (CARDAROPOLI et al., 2005; ARAÚJO et al., 2011), enquanto outros relatam limitada influência sob este processo (FICKL et al., 2008a, 2008b; HSU et al., 2010; CANEVA et al., 2012). Os três biomateriais utilizados em nosso estudo (BB, BC e BG) foram superiores ao Ab na preservação vertical da crista óssea distal em 8 e 16 semanas, com e sem o uso de membrana ($p<0,05$).

Com relação ao mais coronal ponto de contato osso-implante (IS-B), o BG proporcionou pontos de contato ósseo mais altos que os demais tratamentos em 8 e 16 semanas sem o uso da membrana ($p<0,05$). No entanto, os estudos de Botticelli et al. (2004) e Sivoilella et al. (2013) demonstraram que o biomaterial pouco colaborou no processo de formação óssea e consequente nível de contato osso-implante mais coronal no interior dos defeitos. Quando utilizada a membrana, o BB obteve resultados superiores aos demais nos dois períodos avaliados ($p<0,05$).

Analisando os limites do defeito, quantificou-se a área de formação óssea, biomaterial remanescente e presença de tecido mole. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas comparações intergrupos para os três parâmetros avaliados ($p<0,05$). Apesar das já descritas alterações morfológicas que sofre o alvéolo dental pós-extração, o mesmo passa por uma fase de exacerbada formação óssea nos primeiros 30 dias e subsequente reabsorção de aproximadamente 15% do novo osso formado com gradual substituição por medula óssea (CARDAROPOLI et al., 2003). No modelo experimental adotado com defeitos cirurgicamente criados, foi observada diminuição da formação óssea do período de 8 ao de 16 semanas em todos os tratamentos quando não se utilizou recobrimento com membrana. De modo geral,

o BB apresentou a menor área de formação óssea dentre todos os sítios tratados, em ambos os períodos, independente do uso da membrana ($p < 0,05$). Outros estudos experimentais que utilizaram biomateriais em bloco e avaliaram a formação óssea obtida corroboram com os nossos achados. Diante dos modelos utilizados, a neoformação óssea foi escassa, porém com boa biocompatibilidade, interação biológica com o osso recipiente e boa manutenção de volume final (CESTARI et al., 2009; FARIA et al., 2010; DE SANTIS et al., 2011). O BC apresentou o melhor desempenho de formação óssea entre os biomateriais em 8 semanas (sem membrana) e em 8 e 16 semanas (com membrana), inferior apenas ao Ab e Cg ($p < 0,05$). Estes achados são suportados por estudos que também ressaltam sua eficácia (WONG e RABIE, 2010; ARAÚJO et al., 2010). A utilização da membrana de colágeno recobrindo os defeitos tratados permite manutenção do coágulo, migração e povoamento de células formadoras de tecido ósseo ao sítio em questão com ausência de migração competitiva dos tecidos adjacentes (GOTTLOW et al., 1984). O efeito biológico benéfico do seu uso pôde ser constatado no presente estudo. Nos defeitos recobertos com membrana foram observados valores superiores de área de formação óssea em todos os sítios tratados, se comparados aos que não tiveram seu recobrimento ($p < 0,05$).

Com relação à área de biomaterial remanescente, a presença de biomaterial residual foi observada em quantidades variáveis em todos os defeitos tratados, mesmo no período mais tardio (16 semanas). Todos os biomateriais reabsorveram parcialmente em 16 semanas se comparados ao período mais precoce (8 semanas) ($p < 0,05$). Estudos experimentais têm reportado lenta propriedade reabsortiva e consequente manutenção de volume do osso xenógeno em bloco (CESTARI et al., 2009; SCHWARZ et al., 2010). Já De Santis et al. (2011) relatam extensa reabsorção do mesmo em período de 6 meses. No presente estudo, o BB apresentou maior quantidade remanescente que os demais biomateriais nos dois períodos avaliados, com e sem o uso de membrana ($p < 0,05$). As divergências citadas podem ser atribuídas aos diferentes modelos experimentais adotados em cada estudo.

Na avaliação da área de tecido mole no interior do defeito, foi evidenciada presença equivalente e pouco variável de tecido mole, independente do tempo de

avaliação ou uso de membrana que, quando não utilizada, a quantidade de tecido mole aumentou do período mais precoce ao mais tardio ($p<0,05$). Uma relação inversa pôde ser vista no que diz respeito ao uso da membrana. O tecido mole no interior do defeito diminuiu quando a membrana foi utilizada na comparação à sua não utilização nos dois períodos de avaliação ($p<0,05$). Os achados descritos reforçam os princípios da regeneração óssea guiada, em que houve proteção do coágulo e criação de espaço isolado para formação óssea sem a competição com os demais tecidos, proporcionando assim maior quantidade de formação óssea e consequente menor área de infiltração de tecido conjuntivo (DAHLIN et al., 1988).

Realizando uma revisão na literatura a respeito dos tecidos moles periimplantares uma escassez de informações é encontrada e os achados de estudos experimentais pobremente discutidos. Na tentativa de justificar tal carência de dados, Hermann et al. (2000) atribui à dificuldade técnica na preparação de cortes histológicos que combinem tecido mole, osso e implantes em condições ideais de análise. No presente estudo, em todos os sítios tratados a mucosa periimplantar esteve coberta por epitélio queratinizado e a sua borda marginal conectada a uma barreira epitelial em contato com a superfície do implante. O tecido epitelial e conjuntivo não sofreu grandes variações dimensionais e manteve-se relativamente constante, independente do tratamento, tempo experimental ou uso de membrana de colágeno recobrando os defeitos ósseos ($p>0,05$). Especula-se que as ausências de grandes variações encontradas podem estar diretamente ligadas à característica de comportamento biológico inerente ao modelo experimental adotado no presente estudo. Apesar das alterações dimensionais em altura identificadas na medida da distância entre o ombro do implante e o topo da crista óssea distal (IS-C) ($p<0,05$), o achado não foi capaz de repercutir em variação perceptível de área de tecido conjuntivo e epitelial na região do teto do defeito. Os dados citados contrariam os encontrados por Bressan et al. (2012), que relataram o posicionamento do ponto mais coronal da mucosa periimplantar abaixo do ombro do implante nos casos de reabsorção mais severa da tábua óssea. Vale salientar que os achados descritos pelo estudo citado foram obtidos por cortes histológicos no sentido vestibulo-lingual, diferentemente dos analisados no presente estudo. Adicionalmente, é importante

ressaltar que em nosso estudo o controle de placa só foi realizado duas vezes no período pós-operatório para cada um dos lados.

Os valores obtidos nas medidas lineares de distância TI-CMP e IS-CMP demonstraram que em nenhum tratamento testado houve presença de recessão tecidual em grau significativo ($p>0,05$). Em todos os casos, a porção mais coronal da mucosa periimplantar foi encontrada acima do ombro do implante e em localizações variáveis em relação ao parafuso cicatrizador. Este achado reafirma as recomendações do estudo de Carmagnola et al. (2002). Em estudo que avaliou o preenchimento de defeitos mecanicamente produzidos em mandíbula de cães, afirmaram que o procedimento de preenchimento do defeito evita o colapso dos tecidos e ameniza a maior invaginação de tecido mole para o seu interior.

A inserção de tecido mole ao redor de implantes de titânio consiste em uma zona de tecido epitelial e conjuntivo, representadas pelo epitélio juncional e tecido conjuntivo gengival, respectivamente (CHIEN et al., 2013). A extensão de epitélio juncional e íntimo contato com a superfície do implante conferem selamento à entrada de microrganismos que uma vez colonizados, poderão colocar em risco o sucesso clínico de sua instalação (ESPOSITO et al., 2011). Esta região é, portanto considerada crítica para a defesa inata contra a inflamação periimplantar, agindo como primeira linha de defesa na proteção à invasão de alguns patógenos (IKEDA et al., 2002). As medidas referentes à extensão do epitélio juncional (ABE-CMP) mantiveram-se similares e sem grandes variações nos diversos tipos de tratamentos e tempos experimentais testados com exceção dos sítios tratados com Cg em 16 semanas, porém sem diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$). Com relação ao selamento de tecido conjuntivo (ABE-CCO), todos os tratamentos obtiveram espessura mínima de 2,5 mm em altura. Em teoria, a boa espessura de tecido conjuntivo proporcionaria adequado selamento do tecido mole em relação aos tecidos subjacentes. No presente estudo, o modelo experimental utilizado avaliou a capacidade de diferentes tipos de tratamento em reparar um defeito ósseo cirurgicamente confeccionado. A presença de uma espessa faixa de tecido conjuntivo junto ao implante se deu supostamente por migração competitiva excessiva do tecido mole ao interior do defeito, prejudicando o preenchimento do referido espaço por

tecido ósseo. Este fato pôde ser comprovado pela medida do ombro do implante ao ponto mais coronal de contato osso-implante (IS-B), em que a altura do ombro do implante ao primeiro contato osso-implante variou entre 2 e 4 mm ($p<0,05$).

A micro-tomografia é um método não destrutivo, rápido e preciso que permite medidas do osso trabecular e cortical. Fornece representação espacial da formação óssea na superfície do implante e regiões adjacentes em poucos micrômetros e é capaz de avaliar morfometria qualitativa e quantitativa da integração óssea nos mesmos (SWAIN e XUE, 2009). Analisando a literatura, uma escassez de estudos que utilizam análise micro-tomográfica para avaliação de modelo experimental de defeitos ao redor de implantes foi encontrada. Baseado nos parâmetros fornecidos pelo equipamento, o presente estudo avaliou e quantificou a formação óssea no interior de defeitos periimplantares em diferentes tipos de tratamento. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas comparações intergrupos para os parâmetros área de superfície de osso, área de superfície óssea/volume de osso e espessura de trabeculado ósseo ($p<0,05$). Os defeitos tratados com BG apresentaram maior área de superfície que os demais em 8 e 16 semanas sem membrana e semelhante ao Ab (8 semanas com membrana). Chackartchi et al. (2011) compararam por histomorfometria e micro-tomografia a quantidade de osso formado em procedimentos de elevação da mucosa de seio maxilar com BG de dois tamanhos distintos. Após análise dos dados, observaram que ambos os tamanhos de grânulos mostraram área de superfície óssea semelhantes e boa capacidade de formação óssea em seios maxilares. Em nosso estudo, o BC proporcionou maior área de superfície óssea em 16 semanas com o uso da membrana ($p<0,05$). Avaliando-se a razão entre os valores obtidos de área de superfície de osso e o volume total de osso, o uso do BC resultou em maiores valores em 8 semanas sem membrana e em 16 semanas com e sem membrana. Nevins et al. (2005) utilizou o referido biomaterial para reparo de defeitos em dentes acometidos por perda óssea vertical severa em pacientes com doença periodontal avançada. Após um período de 9 meses, biópsias loco-regionais foram realizadas e submetidas a análise micro-tomográfica e histológica. Ressaltaram a boa capacidade do BC em proporcionar formação óssea em defeitos periodontais. Ainda neste parâmetro, os três biomateriais utilizados no presente estudo mostraram

resultados superiores ao Ab e Cg, independente do tempo experimental ou uso de membrana ($p < 0,05$). A espessura de trabeculado ósseo analisada revelou valores superiores em sítios tratados com Ab em 8 e 16 semanas, com e sem o uso de membrana ($p < 0,05$). Baseando-se no Ab como controle padrão de formação óssea o mais natural e fisiológico possível, o BC foi o biomaterial que proporcionou valores de espessura de trabeculado no osso neoformado mais próximos do mesmo em todas as situações avaliadas ($p < 0,05$).

Comparando os dados obtidos na análise micro-tomográfica com a histomorfometria, inúmeras divergências puderam ser observadas. Alguns estudos avaliaram o nível de correlação entre os métodos. Enquanto uns encontraram fortes correlações (PARK et al., 2005; NEVINS et al., 2005; BUTZ et al., 2006; NEIVA et al., 2011), outro não observou correlação entre as referidas análises (SCHOUTEN et al., 2009). No presente estudo, o tratamento de melhor desempenho foi, na maioria dos casos, divergente se comparados os resultados obtidos nas duas análises. Esta incompatibilidade entre os valores absolutos pode ser explicada pelo procedimento de definição da escala de cinza “threshold” utilizada na análise micro-tomográfica. Além de ausência de padronização de escalas nos diversos estudos, sabe-se que a acurácia da análise é baseada na habilidade do avaliador em definir corretos “thresholds”, separando os níveis de cinza da imagem. A partir desta definição, o programa de computador quantifica as imagens e fornece valores de acordo com os diversos parâmetros estudados. Em algumas situações a distinção dos limites entre o novo osso formado e partículas remanescentes de biomaterial é difícil, além da pequena, porém presente área artefactual proveniente do metal do implante de titânio (SCHOUTEN et al., 2009; CHACKARTCHI et al., 2011). Em nosso estudo, os VOIs foram delimitados fora da área artefactual proveniente dos implantes. Além disso, foram definidos valores de escala de cinza padrão para os biomateriais e para novo osso formado, de modo que após duas aferições realizadas isoladamente, os valores fossem subtraídos e o valor real de osso neoformado no interior dos defeitos fosse obtido. Outro fator que poderia explicar tal divergência entre os valores das duas análises é a avaliação em três dimensões proporcionada pela micro-tomografia. Enquanto que na lâmina histológica obtida por desgaste avalia-se um único corte no centro do defeito de

aproximadamente 90 µm em espessura, na análise micro-tomográfica analisamos as informações contidas em 217 cortes de 12 µm, contemplando toda a área do defeito em três dimensões.

A porosidade pode ser definida como o percentual de espaço vazio em um sólido, sendo considerada uma característica morfológica do biomaterial em questão (LEON Y LEON, 1998). Sabe-se que a presença de poros se faz necessária para a formação de tecido ósseo, viabilizando espaços para migração de osteoblastos e células mesenquimais e para o processo de vascularização (KUBOKI et al., 1998). Adicionalmente, uma superfície porosa aumenta a interação mecânica entre o biomaterial e o osso circunjacente em uma interface considerada crítica (STORY et al., 1998). No presente estudo, a porosidade *in vitro* dos biomateriais foi avaliada através da micro-tomografia. Foram obtidos valores no que diz respeito à espessura de trabeculado, número, volume, área de superfície e porosidade de poros fechados, volume e porosidade de poros abertos e porosidade total. A que se tenha conhecimento, não há registros na literatura pertinente de informações relativas à topografia e porosidade dos biomateriais utilizados em nosso estudo. O BB apresentou maior espessura de trabeculado ósseo, volume e porosidade de poros abertos e porosidade total. Já o BG obteve maior número, volume e área de superfície de poros fechados. O BC mostrou-se em posição intermediária entre os demais. Quando comparados os resultados observados na presente análise com os achados das análises histológica e micro-tomográfica dos espécimes (*in vivo*), pôde-se constatar uma relação inversa entre porosidade e formação óssea. O BB foi visto na análise *in vitro* como o mais poroso dos materiais testados. No entanto, obteve o pior desempenho na formação óssea *in vivo*, contrariando a teoria de que a grande área de superfície de poros e micro-porosidade contribui para maior adsorção protéica do sangue e fluidos intersticiais, além da troca iônica, viabilizando ampla interação do biomaterial com o meio e condições mais favoráveis para formação óssea (YUAN et al., 1999). Já o BG, que na análise *in vitro* mostrou-se como o menos poroso entre os biomateriais testados, apresentou os melhores resultados *in vivo*. Apesar dos já comprovados achados sobre os benefícios de uma estrutura porosa nos biomateriais, admite-se que a porosidade, volume e tamanho de poros não podem ser

determinados isoladamente como a chave para obtenção de bons resultados de formação óssea, pela alta complexidade dos processos biológicos que ocorrem durante o metabolismo ósseo. A dificuldade em reproduzir os mesmos resultados obtidos *in vitro* em um modelo experimental *in vivo* demonstra tais limitações (ROSA et al., 2008).

No presente estudo, a hipótese de que a colocação de um biomaterial em bloco com arcabouço micro e macro-poroso semelhante ao osso humano para reconstruir o defeito proporcionaria formação óssea mais eficaz não foi comprovada. Acredita-se que a formação óssea escassa, porém bem distribuída na superfície do BB poderia progredir a nível mais satisfatório em períodos mais tardios do que o avaliado neste estudo (16 semanas). O lento padrão reabsortivo do osso xenogênico proporcionaria estabilidade em longo prazo ao osso neoformado no interior do defeito e o consequente resultado final clinicamente melhor. Além disso, a dificuldade técnica na estabilização do bloco por um aspecto vestibular durante o procedimento cirúrgico, inviabilizando um modelo experimental que se aproximasse mais da realidade clínica, faz com que os resultados relacionados à reabsorção da crista óssea sejam extrapolados com cautela. Os demais materiais porosos utilizados (BC e BG) demonstraram importante papel na formação óssea, com desempenho igual ou superior ao Ab em situações específicas.

Baseado nos resultados obtidos no presente estudo e revisão da literatura, o tratamento mais eficaz para minimizar os efeitos do intenso processo de remodelamento das tábuas ósseas do alvéolo pós-extração e completo reparo de defeitos permanece ainda incipiente. Pesquisas futuras com biologia molecular para estudar as bases do metabolismo ósseo que expliquem este processo, além do avanço da engenharia tecidual no desenvolvimento de material com características de biocompatibilidade, mecânicas e de porosidade ideais, fabricado sob medida às necessidades do paciente, combinado com células tronco e fatores de crescimento parece ser o caminho para se chegar ao desejado sucesso, resolução do problema e êxito no resultado final do tratamento.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pôde-se concluir:

1. A implantação de bloco de alta porosidade (BB) na região cervical do implante falhou em proporcionar maior reparo ósseo no interior do defeito e foi o tratamento que mais reduziu a reabsorção da crista óssea alveolar distal;
2. Biomateriais com menor porosidade (BC e BG) apresentaram superior ou semelhante formação óssea e estabilidade dos implantes em comparação ao osso autógeno;
3. A utilização da técnica de ROG resultou em maior formação óssea em todos os tratamentos testados e nos dois períodos de avaliação e reduziu a presença de tecido mole no interior do defeito;
4. Uma relação inversa entre a porosidade *in vitro* dos biomateriais e formação óssea *in vivo* foi observada no modelo experimental adotado.

REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS

Abushahba F, Renvert S, Polyzois I, Claffey N. Effect of grafting materials on osseointegration of dental implants surrounded by circumferential bone defects - An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* 2008; 19:329-334.

Akimoto K, Becker W, Persson R, Baker DA, Rohrer MD, O'Neal RB. Evaluation of Titanium Implants Placed into Simulated Extraction Sockets: A Study in Dogs. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 1999; 14:351-360.

Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 1981; 52(2):155-70.

Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 1969; 27:309-18.

Antunes AA, Oliveira Neto P, de Santis E, Caneva M, Botticelli D, Salata LA. Comparisons between Bio-Oss(®) and Straumann(®) Bone Ceramic in immediate and staged implant placement in dogs mandible bone defects. *Clinical Oral Implants Research* 2013; 24:135-42.

Aparicio C, Lang NP, Rangert B. Validity and clinical significance of biomechanical testing of implant/bone interface. *Clinical Oral Implants Research* 2006; 17 Suppl 2:2-7.

Araújo MG, Carmagnola D, Berglundh T, Thilander B, Lindhe J. Orthodontic movement in bone defects augmented with Bio-Oss. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* 2001; 28:73-80.

Araújo MG, Sonohara M, Hayacibara R, Cardaropoli G, Lindhe J. Lateral ridge augmentation by the use of grafts comprised of autologous bone or a biomaterial. An experiment in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* 2002; 29:1122-31.

Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* 2005; 32:212-8.

Araújo MG, Sukekava F, Wennström JL, Lindhe J. Ridge alterations following implant placement in fresh extraction sockets: an experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* 2005; 32:645-52.

Araújo 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. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 2008; 28:123-35.

Araújo M, Linder E, Lindhe J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. *Clinical Oral Implants Research* 2009; 20:1-6.

Araújo MG, Liljenberg B, Lindhe J. Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* 2010; 21:55-64.

Araújo MG, Linder E, Lindhe J. Bio-Oss collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* 2011; 22:1-8.

Baffone GM, Botticelli D, Pantani F, Cardoso LC, Schweikert MT, Lang NP. Influence of various implant platform configurations on peri-implant tissue dimensions: an experimental study in dog. *Clinical Oral Implants Research* 2011; 22:438-44.

Barewal RM, Oates TW, Meredith N, Cochran DL. Resonance frequency measurement of implant stability in vivo on implants with a sandblasted and acid-etched surface. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 2003; 18:641-51.

Barzilay I, Graser GN, Iranpour B, Proskin HM. Immediate implantation of pure titanium implants into extraction sockets of *Macaca fascicularis*. Part I: clinical and radiographic assessment. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 1996a; 11:299-310.

Barzilay I, Graser GN, Iranpour B, Natiella JR, Proskin HM. Immediate implantation of pure titanium implants into extraction socket of *Macaca fascicularis*. Part II: histologic observations. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 1996b; 11:489-497.

Bassett CA, Campbell JB, Girado JM, Rossi JP, Seymour RJ. Application of monomolecular filter tubes in bridging gaps in peripheral nerves and for prevention of neuroma formation: a preliminary report. *Journal of Neurosurgery* 1956; 13:635-7.

Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss - An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* 1997; 8:117-124.

Botticelli D, Berglundh T, Lindhe J. The influence of a biomaterial on the closure of a marginal hard tissue defect adjacent to implants. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* 2004; 15:285-292.

Bressan E, Sivoletta S, Urrutia ZA, Salata LA, Lang NP, Botticelli D. Short implants (6 mm) installed immediately into extraction sockets: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 2012; 23:536-41.

Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *Journal of Periodontology* 2001; 72:215-29.

Butz F, Ogawa T, Chang TL, Nishimura I. Three-dimensional bone-implant integration profiling using micro-computed tomography. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 2006; 21:687-95.

Caneva M, Botticelli D, Salata LA, Souza SLS, Cardoso LC, Lang NP. Collagen membranes at immediate implants: a histomorphometric study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 2010a; 21:891-897.

Caneva M, Salata LA, de Souza SS, Bressan E, Botticelli D, Lang NP. Hard tissue formation adjacent to implants of various size and configuration immediately placed into extraction sockets: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 2010b; 21:885-90.

Caneva M, Botticelli D, Salata LA, Souza SL, Bressan E, Lang NP. Flap vs. "flapless" surgical approach at immediate implants: a histomorphometric study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 2010c; 21:1314-9.

Caneva M, Salata LA, de Souza SS, Baffone G, Lang NP, Botticelli D. Influence of implant positioning in extraction sockets on osseointegration: histomorphometric analyses in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 2010d; 21:43-9.

Caneva M, Botticelli D, Pantani F, Baffone GM, Rangel IG Jr, Lang NP. Deproteinized bovine bone mineral in marginal defects at implants installed immediately into extraction sockets: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 2012; 23:106-12.

Caneva M, Botticelli D, Viganò P, Morelli F, Rea M, Lang NP. Connective tissue grafts in conjunction with implants installed immediately into extraction sockets. An experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 2013; 24:50-6.

Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* 2003; 30:809-18.

Cardaropoli G, Araújo M, Hayacibara R, Sukekava F, Lindhe J. Healing of extraction sockets and surgically produced - augmented and non-augmented - defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* 2005; 32:435-40.

Carmagnola D, Berglundh T, Araújo M, Albrektsson T, Lindhe J. Bone healing around implants placed in a jaw defect augmented with Bio-Oss - An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* 2000; 27:799-805.

Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. *Clinical Oral Implants Research* 2003; 14:137-143.

Carmagnola D, Abati S, Celestino S, Chiapasco M, Bosshardt D, Lang NP. Oral Implants Placed in Bone Defects Treated with Bio-Oss, Ostim- Paste or PerioGlas: an experimental study in the rabbit tibiae. *Clinical Oral Implants Research* 2008; 19:1246-1253.

Cestari TM, Granjeiro JM, de Assis GF, Garlet GP, Taga R. Bone repair and augmentation using block of sintered bovine-derived anorganic bone graft in cranial bone defect model. *Clinical Oral Implants Research* 2009; 20:340-50.

Chackartchi T, Iezzi G, Goldstein M, Klinger A, Soskolne A, Piattelli A, Shapira L. Sinus floor augmentation using large (1-2 mm) or small (0.25-1 mm) bovine bone mineral particles: a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. *Clinical Oral Implants Research* 2011; 22:473-80.

Chien HH, Schroering R, Prasad H, Tatakis D. The Effects of a New Implant Abutment Design on Peri-Implant Soft Tissues. *Journal of Oral Implantology* 2013 Jan 22. [Epub ahead of print]

Dahlin C, Lindhe A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1988; 81:672-676.

De Santis E, Lang NP, Scala A, Viganò P, Salata LA, Botticelli D. Healing outcomes at implants installed in grafted sites: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 2012; 23:340-50.

Esposito M, Pellegrino G, Pistilli R, Felice P. Rehabilitation of posterior atrophic edentulous jaws: prostheses supported by 5 mm short implants or by longer implants in augmented bone? One-year results from a pilot randomized clinical trial. *European Journal of Oral Implantology* 2011; 4:21-30.

Faria PE, Carvalho AL, Felipucci DN, Wen C, Sennerby L, Salata LA. Bone formation following implantation of titanium sponge rods into humeral osteotomies in dogs: a histological and histometrical study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 2010; 12:72-9.

Ferrus J, Cecchinato D, Pjetursson EB, Lang NP, Sanz M, Lindhe J. Factors influencing ridge alterations following immediate implant placement into extraction sockets. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Jan;21(1):22-9.

Fickl S, Zuhr O, Wachtel H, Bolz W, Huerzeler MB. Hard tissue alterations after socket preservation: an experimental study in the beagle dog. *Clinical Oral Implants Research* 2008a; 19:1111-8.

Fickl S, Zuhr O, Wachtel H, Stappert CF, Stein JM, Hürzeler MB. Dimensional changes of the alveolar ridge contour after different socket preservation techniques. *Journal of Clinical Periodontology* 2008b; 35:906-13.

Fickl S, Zuhr O, Wachtel H, Kebschull M, Hürzeler MB. Hard tissue alterations after socket preservation with additional buccal overbuilding: a study in the beagle dog. *Journal of Clinical Periodontology* 2009; 36:898-904.

Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *Journal of Clinical Periodontology* 1984; 11:494-503.

Hämmerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clinical Oral Implants Research* 1998; 9:151-62.

Hermann JS, Buser D, Schenk RK, Higginbottom FL, Cochran DL. Biological width around titanium implants. A physiologically formed and stable dimension over time. *Clinical Oral Implants Research* 2000; 11:1-11.

Hjorting-Hansen E, Worsaae N, Lemons JE. Histologic response after implantation of porous hydroxylapatite ceramic in humans. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 1990; 5:255-263.

Hsu KM, Choi BH, Ko CY, Kim HS, Xuan F, Jeong SM. Ridge alterations following immediate implant placement and the treatment of bone defects with Bio-Oss in an animal model. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 2012; 14:690-5.

Hürzeler MB, Quiñones CR, Kirsch A, Gloker C, Schüpbach P, Strub JR, Caffesse RG. Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part I. Evaluation of anorganic bovine-derived bone matrix. *Clinical Oral Implants Research* 1997; 8:476-86.

Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CX, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2007; 1:245-60.

Huwiler MA, Pjetursson BE, Bosshardt DD, Salvi GE, Lang NP. Resonance frequency analysis in relation to jawbone characteristics and during early healing of implant installation. *Clinical Oral Implants Research* 2007; 18:275-80.

Ikeda H, Shiraiwa M, Yamaza T, Yoshinari M, Kido MA, Ayukawa Y, Inoue T, Koyano K, Tanaka T. Difference in the penetration of horseradish peroxidase tracer as a foreign substance into the peri-implant epithelium or junctional epithelium of rat gingivae. *Clinical Oral Implants Research* 2002; 13:243-251.

Kahnberg KE. Restoration of mandibular jaw defects in the rabbit by subperiosteally implanted Teflon mantle leaf. *International Journal of Oral Surgery* 1979; 8:449-56.

Karabuda C, Sandalli P, Yalcin S, Steflik DE, Parr GR. Histologic and histomorphometric comparison of immediately placed hydroxyapatite-coated and titanium plasma-sprayed implants: a pilot study in dogs. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 1999; 14:510–515.

Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26:5474-91.

Kasten P, Beyen I, Niemeyer P, Luginbühl R, Böhner M, Richter W. Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. *Acta Biomaterialia* 2008; 4:1904-15.

Kim K, Yeatts A, Dean D, Fisher JP. Stereolithographic bone scaffold design parameters: osteogenic differentiation and signal expression. *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 2010; 16:523-39.

Kohal RJ, Mellas P, Hürzeler MB, Trejo PM, Morrison E, Caffesse RG. The effects of guided bone regeneration and grafting on implants placed into immediate extraction sockets. An experimental study in dogs. *Journal of Periodontology* 1998; 69:927-937.

Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, Nagai N, Dohi Y, Ohgushi H. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998; 39:190-9.

Kunnekel AT, Nair KC, Naidu EM, Sivagami G. Validation of resonance frequency analysis by comparing implant stability quotient values with histomorphometric data. *Journal of Oral Implantology* 2011; 37:301-8.

Leon y Leon CA. New perspectives in mercury porosimetry. *Advances in Colloid Interface Science* 1998; 76-77:341-72.

Lewandrowski KU, Gresser JD, Bondre S, Silva AE, Wise DL, Trantolo DJ. Developing porosity of poly(propylene glycol-co-fumaric acid) bone graft substitutes and the effect on osteointegration: a preliminary histology study in rats. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition* 2000; 11:879-89.

Lickorish D, Guan L, Davies JE. A three-phase, fully resorbable, polyester/calcium phosphate scaffold for bone tissue engineering: Evolution of scaffold design. *Biomaterials* 2007; 28:1495-502.

Lin WL, McCulloch CA, Cho MI. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *The Anatomical Record* 1994; 240:492-506.

Melcher AH. Role of the periosteum in repair of wounds of the parietal bone of the rat. *Archives of Oral Biology* 1969; 14:1101-9.

Meredith N, Book K, Friberg B, Jemt T, Sennerby L. Resonance frequency measurements of implant stability in vivo. A cross-sectional and longitudinal study of resonance frequency measurements on implants in the edentulous and partially dentate maxilla. *Clinical Oral Implants Research* 1997a; 8:226-33.

Meredith N, Shagaldi F, Alleyne D, Sennerby L, Cawley P. The application of resonance frequency measurements to study the stability of titanium implants during healing in the rabbit tibia. *Clinical Oral Implants Research* 1997b; 8:234-43.

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. *Clinical Oral Implants Research* 2010; 21:961-970.

Neiva R, Pagni G, Duarte F, Park CH, Yi E, Holman LA, Giannobile WV. Analysis of tissue neogenesis in extraction sockets treated with guided bone regeneration: clinical, histologic, and micro-CT results. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 2011; 31:457-69.

Nevins ML, Camelo M, Rebaudi A, Lynch SE, Nevins M. Three-dimensional micro-computed tomographic evaluation of periodontal regeneration: a human report of intrabony defects treated with Bio-Oss collagen. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 2005; 25:365-73.

Nkenke E, Lehner B, Fenner M, Roman FS, Thams U, Neukam FW, Radespiel-Tröger M. Immediate versus delayed loading of dental implants in the maxillae of minipigs: follow-up of implant stability and implant failures. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 2005; 20:39-47.

Olsson M, Urde G, Andersen JB, Sennerby L. Early loading of maxillary fixed cross-arch dental prostheses supported by six or eight oxidized titanium implants: results after 1 year of loading, case series. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 2003; 5 Suppl 1:81-7.

Paolantonio M, Dolci M, Scarano A, d'Archivio D, di Placido G, Tumini V, Piattelli A. Immediate implantation in fresh extraction sockets. A controlled clinical and histological study in man. *Journal of Periodontology* 2001; 72:1560-1571.

Park YS, Yi KY, Lee IS, Jung YC. Correlation between microtomography and histomorphometry for assessment of implant osseointegration. *Clinical Oral Implants Research* 2005; 16:156-60.

Polyzois I, Renvert S, Bosshardt DD, Lang NP, Claffey N. Effect of Bio- Oss on Osseointegration of Dental Implants Surrounded by Circunferential Bone Defects of Different Dimensions: an experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* 2007; 18:304-310.

Rosa AL, de Oliveira PT, Beloti MM. Macroporous scaffolds associated with cells to construct a hybrid biomaterial for bone tissue engineering. *Expert Review of Medical Devices* 2008 Nov; 5:719-28.

Rossi F, Botticelli D, Pantani F, Pereira FP, Salata LA, Lang NP. Bone healing pattern in surgically created circumferential defects around submerged implants: an experimental study in dog. *Clinical Oral Implants Research* 2012; 23:41-8.

Roy TD, Simon JL, Ricci JL, Rekow ED, Thompson VP, Parsons JR. Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A.* 2003; 66:283-91.

Salata LA, Burgos PM, Rasmusson L, Novaes AB, Papalexiou V, Dahlin C, Sennerby L. Osseointegration of oxidized and turned implants in circumferential bone defects with and without adjunctive therapies: an experimental study on BMP-2 and autogenous bone graft in the dog mandible. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2007; 36:62-71.

Schouten C, Meijer GJ, van den Beucken JJ, Spauwen PH, Jansen JA. The quantitative assessment of peri-implant bone responses using histomorphometry and micro-computed tomography. *Biomaterials* 2009; 30:4539-49.

Schwarz F, Ferrari D, Balic E, Buser D, Becker J, Sager M. Lateral ridge augmentation using equine- and bovine-derived cancellous bone blocks: a feasibility study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 2010; 21:904-12.

Sivolella S, Bressan E, Salata LA, Quiñones ME, Lang NP, Botticelli D. Deproteinized bovine bone mineral particles and osseointegration of implants without primary bone contact: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*. 2013 Apr 8. doi: 10.1111/clr.12154. [Epub ahead of print]

Sjöström M, Lundgren S, Nilson H, Sennerby L. Monitoring of implant stability in grafted bone using resonance frequency analysis. A clinical study from implant placement to 6 months of loading. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2005; 34:45-51.

Story BJ, Wagner WR, Gaisser DM, Cook SD, Rust-Dawicki AM. In vivo performance of a modified CSTi dental implant coating. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 1998; 13:749-57.

Swain MV, Xue J. State of the art of Micro-CT applications in dental research. *International Journal of Oral Science* 2009; 1:177-88.

Vignoletti F, de Sanctis M, Berglundh T, Abrahamsson I, Sanz M. Early healing of implants placed into fresh extraction sockets: an experimental study in the beagle dog. II: ridge alterations. *Journal of Clinical Periodontology* 2009; 36: 688–697.

West JD, Oates TW. Identification of stability changes for immediately placed dental implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 2007; 22:623-30.

Wilson Jr TG, Schenk R, Buser D, Cochran D. Implants placed in immediate extraction sites: a report of histologic and histometric analyses of human biopsies. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 1998; 13: 333–341.

Wong RWK, Rabie ABM. Effect of Bio-Oss Collagen® and Collagen Matrix on Bone Formation. *The Open Biomedical Engineering Journal* 2010; 4:71–76.

Yuan H, Kurashina K, de Bruijn JD, Li Y, de Groot K, Zhang X. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1999; 20:1799-806.

Zitzmann NU, Schärer P, Marinello CP, Schüpbach P, Berglundh T. Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: a histologic study in humans. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 2001; 21:288-95.