**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto**

Roberto de Oliveira Jabur

**Avaliação clínica, histológica e histomorfométrica do reparo de
defeitos ósseos criados em mandíbula de cães preenchidos
com Biovidro 45S5 ou Biosilicato® após a colocação de
implantes osseointegráveis**

**Ribeirão Preto
2008**

ROBERTO DE OLIVEIRA JABUR

**Avaliação clínica, histológica e histomorfométrica do reparo de
defeitos ósseos criados em mandíbula de cães preenchidos
com Biovidro 45S5 ou Biosilicato® após a colocação de
implantes osseointegráveis**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial
e Periodontia da Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Cirurgia Buco-Maxilo
Facial

Orientador: Valdemar Mallet da Rocha Barros

**Ribeirão Preto
2008**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Jabur, Roberto de Oliveira

Avaliação clínica, histológica e histomorfométrica do reparo de defeitos ósseos criados em mandíbula de cães preenchidos com Biovidro 45S5 ou Biosilicato® após a colocação de implantes osseointegráveis. Ribeirão Preto, 2008.

88 p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Rocha Barros, Valdemar Mallet.

1. Biovidros. 2. Enxerto Ósseo. 3. Implante. 4. Formação Óssea

FOLHA DE APROVAÇÃO

Roberto de Oliveira Jabur

Dissertação apresentada ao Departamento de Cirurgia Bucal-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Cirurgia Bucal-Maxilo-Facial.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr.

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr.

Instituição: _____ Assinatura _____

AGRADECIMENTOS

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Valdir Chaibem Jabur** e **Heloisa de Oliveira Jabur**, e minha amada irmã **Karine**, pessoas batalhadoras que sempre se esforçaram ao máximo para me dar o melhor que a vida poderia oferecer. Obrigado Papai, obrigado Mamãe pelo amor e por serem tão especiais, tão generosos e tão compreensíveis.

Gostaria também de agradecer a Deus por estar sempre ao meu lado, vigiando meus atos e me cercando de pessoas tão especiais e queridas.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Professor Doutor **Valdemar Mallet da Rocha Barros**, pela elaboração do presente trabalho, pela acessibilidade, pelo respeito, pela educação com que sempre me tratou. Pessoa exemplo de caráter, de dignidade e amor ao que faz. Professor muito obrigado por ter me ensinado a ser um professor, e também pelo convívio, tenho no senhor um grande amigo.

Ao Professor Doutor **Marcio Matheus Beloti**, acima de tudo um grande amigo com quem tive o prazer de dividir apartamento por esses anos, companheiro de boas risadas, boas conversas, bons conselhos e acima de tudo por estar sempre disponível quando precisei de sua ajuda. Obrigado Marcio

Ao Professor Doutor **Paulo Tambasco de Oliveira**, pela imensa ajuda, por vezes se privando de seus compromissos pessoais para me ajudar, pessoa impar, e incomparável, muito obrigado pela ajuda e pela convivência.

Ao Professor Doutor **Cássio Edvard Sverzut**, pelos ensinamentos profissionais, pessoais e pela grande amizade que só cresceu durante esses anos de convivência. Obrigado Cássio por ter confiado e feito daquele jovem rapaz um cirurgião.

Ao Professor Doutor **Alexandre Elias Trivellato**, pela sua dedicação, atenção, e por me mostrar o caminho certo, obrigado por fazer de suas noites mal

dormidas minhas noites de aprendizado, por estar sempre disponível, tenho muito orgulho de ter sido seu aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Rose Almeida Nepomuceno**, por agüentar meu estresse, por estar sempre ao meu lado na etapa final e mais difícil desse trabalho, sempre tolerando com bom humor e muito carinho o meu mal humor. Obrigado Rose, por estar ao meu lado, por acreditar que eu conseguiria terminar esse trabalho, você sem dúvida faz parte dele..

Aos Professores e Funcionários

Ao Professor Doutor **Adalberto Luiz Rosa** pela amizade, pelos ensinamentos, pelo respeito e por me confiar responsabilidades sem temer as conseqüências. Obrigado Professor

Agradeço também aos Professores do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, em especial aos Professores **Luiz Antônio Salata**, **Samuel Porfírio Xavier**, obrigado pela harmoniosa convivência.

Agradeço aos meus professores da disciplina de Cirurgia da graduação Professor Doutor **José Sidney Roque** e Professor Doutor **Elio Shinohara** por me fazer gostar tanto desta linda especialidade

Agradeço ao Professor Doutor **Mauricio Zardo**, por acreditar que esse sonho era possível, sempre me incentivando a subir mais um degrau, me dando a

primeira oportunidade profissional, pela grande oportunidade de acompanhar seus passos.

Aos funcionários e técnicos da Faculdade de Odontologia, em especial ao meu amigo Sebastião Bianco, pela colaboração com a Histologia.

Aos funcionários do Biotério **Edson** (Marmita) e **Aldo**, pelo bom humor, pelas brincadeiras e sobre tudo pelo respeito aos animais.

Ao meu amigo e funcionário da Clínica de Cirurgia, **Gledson Antunes**, sempre disponível e sempre solícito.

Agradeço também as secretárias do departamento **Tatiana** e **Dulce**, que sempre me ajudaram e estiveram à disposição.

A todos vocês meu MUITO OBRIGADO

AOS MEUS AMIGOS

Ao meu “irmão” e grande amigo **Adriano Freitas de Assis** (Joe), pelos momentos de alegria, tristeza, festa, lágrimas, enfim tudo que se espera de um grande amigo. Joe obrigado pelos momentos inesquecíveis.

A **Alice Dias Petri** pelos ensinamentos, pois aprendemos juntos a operar, a trabalhar, a estudar, a conviver. Grande incentivadora de mais essa peripécia. Amiga de momentos inesquecíveis, afinal vivenciamos juntos toda a formação. Por algum motivo a vida nos reservou caminhos diferentes e nos separamos, mais saiba que sempre estarei torcendo pelo seu sucesso, em todos os sentidos, você é uma pessoa brilhante, desejo o que de melhor a vida possa lhe trazer. Obrigado “Alicia”.

Aos meus colegas de Especialização: **Thiago Iafelice dos Santos, Marconi Gonzaga Tavares, Juan Carlos Aranibar Seleme, Thales Bianchi**, e em especial aos amigos **Alexander Tadeu Sverzut e Jorge Luis Liporaci Junior**.

Aos meus colegas de mestrado: **Maya Arnez, Wagner Pedrosa, Marcos Oliva**, obrigado pela convivência e pelos ensinamentos

Aos colegas da nova turma de mestrado: **Michel Campos Ribeiro, Rogério Sato, Patrício José de Oliveira Neto, Marcelo Azenha, Gustavo Albuquerque**

Ao parceiro de todas as horas **Rafael Oliveira** “Rafilds”, grande amigo, companheiro profissional e dos esportes. Rafa obrigado pela paciência em aturar esse seu conterrâneo.

A todos meus amigos da Bike, em especial ao **Jorge** “Japonês” por me colocar dentro desse magnífico esporte, e me fazer aceitar suas loucuras sem horário, obrigado por me ajudar a colocar todo o estresse desse trabalho junto a poeira deixada nas trilhas que desbravamos juntos.

Ao Professor **Bruno Galati**, grande boxeador, por me ensinar essa arte, e deixar eu descontar em seus pesados equipamentos de treinamento minha ira, minha revolta, saindo de cada treino, outra pessoa, mais leve e menos estressada. Obrigado Bruno, por ser como é.

Obrigado ao pessoal do Para-Quedismo, por serem tão especiais, tão acolhedores, a cada salto um novo homem, me desculpe pela ausência durante alguns períodos, espero que depois desse trabalho possamos nos reencontrar com mais frequência, e voar.....voar.....

À **FAPESP e CNPq**, pela ajuda financeira, sem o apoio dessas entidades não seria possível desenvolver esse trabalho.

E por fim, agradeço a todos que direta e indiretamente participaram de minha breve estada, na magnífica e acolhedora Ribeirão Preto,

EMOÇÕES

Quando eu estou aqui
Eu vivo esse momento lindo
Olhando prá você
E as mesmas emoções
Sentindo...
São tantas já vividas
São momentos
Que eu não me esqueci
Detalhes de uma vida
Histórias que eu contei aqui...
Amigos eu ganhei
Saudades eu senti partindo
E às vezes eu deixei
Você me ver chorar sorrindo...
Sei tudo que o amor
É capaz de me dar
Eu sei já sofri
Mas não deixo de amar
Se chorei ou se sorri
O importante
É que emoções eu vivi...
São tantas já vividas
São momentos
Que eu não me esqueci
Detalhes de uma vida
Histórias que eu contei aqui...
Eu estou aqui
Vivendo esse momento lindo
De frente prá você
E as emoções se repetindo
Em paz com a vida
E o que ela me trás
Na fé que me faz
Otimista demais
Se chorei ou se sorrir
O importante
É que emoções eu vivi...
Se chorei ou se sorrir
O importante
É que emoções eu vivi...

Roberto Carlos

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO	16
MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
PRIMEIRA ETAPA	25
SEGUNDA ETAPA	28
OBTENÇÃO DO ENXERTO DE OSSO AUTÓGENO	32
MORTE DOS ANIMAIS	33
AVALIAÇÃO CLÍNICA	35
PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	35
AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	39
ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	39
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
RESULTADOS.....	42
ANÁLISE HISTOLÓGICA	44
GRUPOS CONTROLES: SEM COLOCAÇÃO DE MATERIAL E COM A	
COLOCAÇÃO DE OSSO AUTÓGENO.....	44
GRUPO COM COLOCAÇÃO DE BIOVIDRO 45S5 (Bioglass®).....	47
GRUPO COM COLOCAÇÃO DE BIOSILICATO®	48
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	71

RESUMO

O presente trabalho avaliou a formação de tecido ósseo ao redor de implantes osseointegráveis de titânio, após realização de defeitos ósseos, utilizando diferentes tipos de substitutos ósseos.

Foram utilizados 5 cães de raça indeterminada, os pré molares e molares mandibulares foram extraídos, passados 12 semanas, os cães foram submetidos a um novo procedimento cirúrgico aonde foram realizadas as perfurações preconizados pelo fabricante dos implantes, o osso vestibular da mandíbula foi desgastado até que parte da perfuração fosse exposta, os implantes então foram colocados nas respectivas perfurações, ficando com 4 espiras expostas.

Esses defeitos foram preenchidos aleatoriamente com Bioglass® 45S5, Biosilicato®, Osso autógeno, e sem nenhum material de preenchimento.

18 semanas depois da colocação dos implantes os cães foram mortos e suas hemi-mandíbulas contendo os implantes removidas e submetidas aos análises histológicas e histomorfométricas, os dados obtidos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis.

A histologia dos 4 grupos estudados revelaram a presença de tecido ósseo maduro em contato com os implantes, porém sem relação direta com os vidros bioativos e osso autógeno. A porcentagem de contato osso implante, matriz óssea mineralizada ao redor da espira, e área de espelho, não mostraram diferenças estatísticas significantes entre os 4 materiais testados.

Os resultados indicam que a presença de substitutos ósseos não interfere com a formação óssea ao redor dos implantes nesse modelo experimental. E existe

resposta tecidual muito semelhante entre o osso autógeno, Bioglass® 45S5 e Biosilicato

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the amount of bone formation on Ti implants in sites with intra-bony defects filled with different bone substitutes. Mandibular premolars and first molars were extracted from 5 dogs, and after 12 weeks 3 implants were bilaterally placed in sites with intra-bony defects and each implantation site randomly received the following treatment: Biosilicate®, Bioglass® 45S5, autologous bone or no treatment. At 18 weeks after implantation, the hemi-mandibles containing the implants were removed and processed for morphological and histomorphometric analysis. Data were submitted to Kruskal-Wallis and Fisher's test. The histological sections of the 4 experimental groups exhibited mature bone tissue in contact with implants, but not related with bioactive glasses or autologous bone used. The percentage of bone-implant contact, mineralized bone matrix between implant threads, and mineralized bone matrix within mirror area in the treated or non-treated sites were not statistically different among the 4 experimental groups. These results indicates that the presence of the bone substitutes evaluated here did not interfere with bone formation on Ti implants in sites with intra-bony defects. In addition, tissue response to Biosilicate® was similar to that of Bioglass® 45S5 and autologous bone.

INTRODUÇÃO

O emprego de implantes osseointegráveis representa um grande avanço da Odontologia devido às excelentes características de biocompatibilidade com o tecido ósseo, assim como pela resistência dos materiais empregados às forças a que são submetidos. Os implantes dentais têm sido estudados experimentalmente *in vitro* e *in vivo*, respeitando-se padrões rígidos de controle, considerando-se critérios estabelecidos de sucessos aceitos internacionalmente. Diversas situações clínicas requerem o emprego de implantes metálicos combinado com enxertos ósseos ou com substitutos ósseos como os biovidros. O emprego desses enxertos visa a obter melhor formação de novo osso em áreas de defeitos ósseos.

A aplicação de implantes dentais requer adequada quantidade de osso, a fim de fornecer a estabilidade necessária ao implante, a qual pode ser comprometida por defeitos ósseos.

Defeitos ósseos provenientes de perdas ósseas durante ou após extrações, traumatismos, fenestrações e deiscências do osso alveolar na interface osso/implante, ou ainda defeitos associados à colocação imediata do implante podem resultar em insucesso da osseointegração (Wachtel *et al.*, 1991; Mellonig & Nevins, 1995). Esses defeitos ósseos podem ser corrigidos mediante o emprego de enxertos de diversos materiais visando promover osseointegração e melhorar a estética dos tecidos moles adjacentes. Entretanto, pacientes ainda podem apresentar-se com uma variedade de condições clínicas que impedem ou dificultam a colocação ideal de um implante dental.

Diversos critérios têm sido empregados na seleção do material de enxerto, entre os quais se destacam: capacidade de permitir a estabilidade do

implante, poder osteogênico, baixa antigenicidade, fácil disponibilidade, baixo índice de infecção e baixa morbidade. Assim, o material ideal de enxerto deve ser osseointutivo estimulando a osteogênese e osseocondutivo para fornecer condições para o crescimento de vasos sanguíneos e células com potencial osteogênico. Diversos materiais denominados genericamente de biomateriais, têm surgido e utilizados no preenchimento de defeitos ósseos visando o recobrimento das superfícies expostas de implantes osseointegráveis como alternativa ou suplemento do osso autógeno. Entre eles, destaca-se o vidro bioativo.

Moore *et al.* (2001) relatam que os benefícios do emprego de biomateriais incluem a facilidade para sua disponibilização e esterilização, além de proporcionar morbidade reduzida.

O vidro bioativo, inicialmente descrito por Hench em 1971 tem sido empregado como material de preenchimento, pois é biocompatível, a resposta tecidual é excelente e os resultados obtidos são estáveis. A composição do Bioglass 45S5 é 45% SiO₂, 24,5% CaO, 24,5% Na₂O e 6% P₂O₅. O Bioglass® 45S5 tem sido considerado como o material bioativo com maior índice de bioatividade (Wilson & Hench 1993). Esse vidro afeta a atividade de osteoblastos resultando em aumento da formação óssea, tanto *in vitro* como *in vivo* (Ducheine & Qui, 1999).

A atividade osseocondutora do vidro bioativo resulta da formação de uma camada de cálcio-fosfato (Ca – P) semelhante à fase mineral do tecido ósseo, quando o material é implantado *in vivo* (Shepers *et al.*, 1991; Shapoff *et al.*, 1997).

Diversos trabalhos avaliando o emprego de vidro bioativo em defeitos ósseos e em reparo periodontal, têm demonstrado biocompatibilidade e neoformação óssea no interior do defeito ósseo em direção à superfície do implante (Shepers *et al.*, 1991; Shepers *et al.*, 1993; Shepers & Ducheyne 1997; Johnson *et al.*, 1997; Oonishi *et al.* 1999; Villaça *et al.*, 2005).

A reação biológica local em implantes de materiais bioativos é a formação de osso em contato íntimo com a superfície do implante, portanto, o sucesso clínico do implante de biomateriais depende da formação de uma interface osso-implante estável. Entretanto, a osseointegração de um biomaterial não depende somente das propriedades do material empregado, mas também das características e do potencial reparador do osso hospedeiro. Além do estado de saúde do leito ósseo do hospedeiro, contribuem para a osseointegração as características físico-químicas do implante, bem como é influenciada pela habilidade cirúrgica do profissional e facilidades técnicas de implantação (Fini *et al.* 1997).

Shapoff *et al.* (1997) relatam que a base das propriedades dos biovidros é a sua reatividade química nos fluídos teciduais, onde geralmente ocorrem três processos: lixiviação, dissolução e precipitação. A lixiviação ocorre por um mecanismo de troca iônica onde o sódio do vidro é substituído por íons dos fluídos teciduais, o que resulta em mudança do pH local, de ácido para ligeiramente básico, mais favorável para o processo de cura. Simultaneamente ocorre a dissolução do vidro produzindo um gel de sílica com superfície negativa que funciona como núcleo de formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada que atrai osteoblastos, seguindo assim a

mineralização. O resultado é uma interface osseocondutora constituída de uma série de camadas: vidro-gel de sílica-hidroxiapatita carbonatada-osso.

Admite-se que a capacidade osseocondutora dos biomateriais depende também do tamanho das partículas empregadas. Estudos sugerem que partículas de 300µm a 360µm como as do Bioglass® promovem reparo ósseo em nível superior àquele observado com partículas menores que 200µm, as quais seriam absorvidas rapidamente, favorecendo a reação inflamatória inicial, assim como as maiores de 400 µm que não seriam absorvidas. As partículas com tamanho variando entre 300µm e 350µm favorecem a regeneração óssea por meio da deposição óssea no interior das fissuras que ocorrem nessas partículas. A migração celular por entre elas também é favorecida devido aos espaços entre elas mesmas quando condensadas (Schepers *et al.*, 1993).

Schepers & Ducheyne (1997) avaliando o reparo ósseo de defeitos criados em mandíbulas de cães e preenchidos com partículas de vidros bioativos de diferentes composições e tamanhos, preconizaram como sendo ideal o emprego de partículas cujo tamanho varia entre 330µm e 355µm, por favorecer não apenas a osseocondução, mas também a osseostimulação decorrente da diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos no interior das cavidades osteogênicas.

Schepers *et al.* (1998) avaliaram a eficácia de partículas de biovidro (Bioglass) com tamanhos variando de 300 a 350µm no tratamento de defeitos ósseos previamente à colocação de implantes em mandíbulas de cães. Os autores, por meio de análise quantitativa e qualitativa, constataram

maior formação óssea e maior atividade remodeladora no grupo em que o defeito ósseo foi tratado com o emprego do Bioglass.

Recentemente, foi desenvolvido e patenteado no Laboratório de Materiais Vítreatos do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos uma cerâmica de vidro pertencente ao sistema $\text{SiO}_2\text{P}_2\text{O}_5\text{Na}_2\text{OCaO}$, 100% cristalina denominada Biosilicato®

(patente WO 2004/074199; Zanotto *et al.*, 2004) visando sua utilização nas áreas médicas e odontológicas, que vem sendo avaliada como substituto ósseo na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP (Moura-Neto *et al.*, 2005; Roriz *et al.*, 2005).

Hench & West (1996) constataram que a cristalização total do Biosilicato® promove aumento de seu índice de bioatividade para nível superior ao das vitrocerâmicas comercializadas na época.

Roriz *et al.* (2005) realizaram um estudo avaliando histologicamente o Biosilicato® implantado em alvéolo dental. Os autores observaram que os alvéolos tratados com Biosilicato® apresentaram mais formação de tecido mineralizado do que aqueles não tratados. Os resultados sugerem que o Biosilicato® é biocompatível quando colocado em alvéolo dental e que esta biocompatibilidade pode aumentar a formação óssea após a extração dental.

Moura-Neto (2006) avaliou aspectos da osteogênese *in vitro* sobre o Biosilicato (PI 0300644-1) e concluiu a partir dos resultados observados que o Biosilicato avaliado e o Biovidro 45S5 mostram perfil de biocompatibilidade semelhantes, com significativo aumento de áreas de matriz óssea mineralizada sobre a vitrocerâmica (Biosilicato ®).

Peitl (2006) relatou que o Biosilicato parece apresentar as mesmas propriedades dos vidros bioativos com a vantagem de se apresentar na forma cristalina com partículas de arestas reduzidas e de ser mais resistentes mecanicamente do que os biovidros. Essa melhora da propriedade mecânica do Biosilicato é importante, pois a limitação do emprego de vidros bioativos como substitutos ósseos decorre da pobre propriedade mecânica desses materiais (Dieudonné *et al.*, 2002).

Enxertos de osso autógeno devido as suas propriedades osteogênica, osteoindutora e osteocondutora mantêm-se como padrão de enxertos. O emprego desse tipo de enxerto evidencia vantagens em relação às demais técnicas no que se refere à biocompatibilidade e ao potencial regenerador ósseo (Boyne 1999). Bons resultados observados com o emprego de osso autógeno são devidos à ausência de antigenicidade, fácil revascularização, desenvolvimento de reação inflamatória mínima e alto potencial de osseocondução e osseoindução. Tem sido demonstrado que enxerto de osso autógeno particulado promove pronunciada revascularização e pode assim, potencialmente, aumentar a osteogênese no local do enxerto (Axhausen *et al.*, 1956; Rivault *et al.*, 1971). Cabe destacar que a obtenção de osso autógeno para enxertos é limitada a algumas regiões doadoras, pois está associada a aumento da morbidade e do desconforto do paciente.

Em Odontologia o osso empregado para enxerto é freqüentemente obtido de regiões intrabucais como o mento ou a região retro molar ou de regiões extra bucais como a crista ilíaca, calota craniana, tibia, dependendo da quantidade necessária.

O objetivo desse trabalho foi avaliar clínica, histológica e histomorfometricamente o reparo de defeitos ósseos criados em mandíbula de cães preenchidos com Biovidro 45S5 ou Biosilicato®.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cinco cães jovens de raça não definida, pesando entre 26 e 32Kg foram usados neste estudo. Todos animais apresentavam boas condições de saúde sem envolvimento sistêmico, oclusão atraumática e ausência de processos infecciosos bucais, e exibiam toda a dentição permanente irrompida, constatados por um médico veterinário.

A fase experimental teve início após o parecer favorável do Comitê de Ética no uso de animais do Campus de Ribeirão Preto – USP e um período de adaptação do animal de duas semanas. Quinze dias antes do início da fase cirúrgica, os animais receberam vacinas, complexo vitamínico e tratamento antiparasitário.

A fase cirúrgica foi realizada em duas etapas. Na primeira delas foram realizadas as extrações dentais e na segunda, após a confecção de defeitos ósseos, foram colocados os implantes nos locais das extrações.

PRIMEIRA ETAPA

Os cães foram mantidos em jejum alimentar sólido de 12 horas na noite anterior ao procedimento cirúrgico e jejum hídrico nas duas horas que antecederiam o procedimento cirúrgico.

Os animais receberam inicialmente Acepromazina 0,2% variando de 0,005 a 0,1 mg/Kg por via intramuscular como medicação pré-anestésica. Com o animal sedado era aplicado um cateter em seu membro torácico direito utilizando a veia cefálica para infusão de solução fisiológica a 0,9%. Este acesso foi mantido durante todo o procedimento cirúrgico pela infusão contínua de solução fisiológica a 0,9%, visando manter os índices homeostáticos e, principalmente, propiciar acesso rápido, se necessário, para nova infusão do

anestésico ou administração de drogas. A seguir era administrado Buprenorfina 0,001 a 0,002 mg/Kg de peso, por via intramuscular. Quinze minutos após a administração dessas drogas, o animal recebeu Propofol 4,6 a 6,0 mg/Kg de peso por via endovenosa para a indução da anestesia e foi entubado com sonda orotraqueal selecionada de acordo com o seu tamanho e peso e ventilado com oxigênio puro. A anestesia era mantida utilizando Isoflurano 1,5 a 2,5% por meio de vaporizador.

Cumprir destacar que os procedimentos cirúrgicos tiveram a supervisão de Médico Veterinário.

No pré-operatório imediato após a anestesia geral, os cães foram submetidos à anti-sepsia intrabucal por meio do emprego de clorexidina a 0,12% friccionada sobre os dentes com gaze e extra bucal empregando-se solução de polivinil pirrolidona iodo – PVPI – tintura (Riodeine™, Rioquímica Ltda, Brasil). Após a colocação do campo cirúrgico esterilizado sobre o cão, mantendo-se apenas a cabeça exposta, era aplicada injeção de 1,8 mL de anestésico local Scandicaine® (Mepivacaina 2% associada à Noradrenalina 1:100.000) na superfície vestibular da mandíbula, utilizando a técnica de infiltração supra periosteal.

Retalho de espessura total foi realizado nas áreas de primeiro a quarto pré-molares mandibulares bilaterais e os dentes foram extraídos por meio do emprego de fórceps e/ou elevadores, após a realização de odontosecção no sentido vestibulo lingual. Após inspeção e curetagem dos alvéolos visando a eliminação de qualquer tecido mole que poderia estimular a reabsorção da cortical óssea (Matherson 1988), eles foram irrigados com

solução fisiológica a 0,9%, os retalhos reposicionados e suturados por meio de pontos interrompidos utilizando Vicryl[™] 4-0 (Ethicon Ltda, Brasil).

Visando a prevenção de infecção pós-operatória os animais receberam na noite anterior às extrações dentais e quatro dias após a sua realização 20.000 UI de penicilina e estreptomicina (1,0 g/10kg de peso corporal) por via intramuscular (Novaes Junior *et al.*, 1998).

Após a realização de cada um dos procedimentos, durante a fase de reversão da anestesia, foi aplicada uma dose de tramadol 1 a 2 mg/Kg de peso por via intramuscular visando o controle da dor nas primeiras 12 horas de pós operatório. Decorrido este período, o controle da dor era feito empregando maxican 0,2% (0,2 mg de meloxicam por Kg de peso corporal) a cada 24 horas durante 3 dias, por via subcutânea. Caso fosse necessário remediação era empregada dipirona sódica 25 mg/Kg, administrada por via subcutânea.

Durante o período de recuperação da anestesia, até que o animal tivesse recobrado parcialmente os reflexos, ele foi mantido na sala cirúrgica, sendo então transportado para uma sala própria de recuperação onde permanecia cerca de 18 horas até o dia seguinte. Daí, ele era transportado para o canil do biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, onde permanecia durante todo o período experimental. Nos primeiros 10 dias do período pós-operatório os animais foram monitorados diariamente e as feridas inspecionadas a cada 3 dias visando detectar sinais clínicos de complicações ou reações adversas, bem como para monitorar o processo de reparo alveolar. Durante os primeiros 14 dias os cães foram mantidos com dieta pastosa. Oito semanas após o primeiro procedimento os animais foram submetidos à segunda etapa do procedimento cirúrgico.

SEGUNDA ETAPA

Nessa etapa foram colocados os implantes dentais após confecção dos defeitos ósseos, que eram recobertos pelos materiais a serem avaliados (Biosilicato®, Biovidro 45S5) ou por osso autógeno, empregado como controle ou ainda não eram recobertos por nenhum material.

Visando a prevenção de infecção pós-operatória os animais receberam na noite anterior ao segundo procedimento cirúrgico para a colocação dos implantes e quatro dias após a sua realização 20.000 UI de penicilina e estreptomicina (1,0 g/10 kg de peso corporal) por via intramuscular (Novaes Junior *et al.*, 1998).

A semelhança do que ocorreu na primeira etapa, os animais foram mantidos em jejum alimentar sólido de 12 horas e jejum hídrico nas duas horas que antecederiam o procedimento cirúrgico.

Após a sedação conforme descrito anteriormente, os cães foram posicionados na mesa cirúrgica e no pré-operatório imediato foram submetidos à anti-sepsia intrabucal por meio do emprego de clorexidina a 0,12% friccionada sobre os dentes com gaze e extra bucal empregando-se solução de polivinil pirrolidona iodo – PVPI – tintura (Riodeine™, Rioquímica Ltda, Brasil). Após a colocação do campo cirúrgico esterilizado sobre o cão era aplicada injeção de 1,8 mL de anestésico local Scandicaine® (Mepivacaina 2% associada à Noradrenalina 1:100.000) na superfície vestibular da mandíbula, utilizando a técnica de infiltração supra periosteal.

Após a anestesia local era realizada uma incisão linear bilateral sobre o rebordo alveolar inferior e confeccionado um retalho e espessura total

desde a distal do canino até a mesial do primeiro molar e, em cada um dos lados da mandíbula, foram colocados três implantes de 3,75 X 9,0 mm (Neodent®, Curitiba, PR, Brasil) de acordo com orientações do fabricante.

Previamente à colocação dos implantes foi realizado um desgaste na superfície vestibular da mandíbula, utilizando broca maxicut em forma de pêra em baixa rotação acionada por motor elétrico sob irrigação abundante com solução fisiológica a 0,9%, a fim de produzir um defeito ósseo que não prejudique a estabilidade do implante na área das extrações dentais, cuja altura era de 6 mm. Esses defeitos apresentavam dimensões similares em torno de 3,75 X 6,0 mm, expondo dessa forma, 4 a 6 roscas do implante. Após a confecção do defeito ósseo a cavidade cirúrgica era inspecionada, curetada e irrigada abundantemente com solução fisiológica, sendo então colocado o implante.

Foi padronizada tanto a angulação como a distância entre os implantes que era de 10 mm, utilizando um dispositivo em aço inoxidável. A fim de uniformizar a estabilidade dos implantes foi utilizada catraca com torquímetro no momento da inserção do implante (45N.cm no mínimo). A estabilidade primária do implante era obtida pelo contato osso /implante (COI) na região apical do implante (3mm).

O recobrimento dos defeitos ósseos foi feito com cada um dos materiais a serem avaliados (Biovidro 45S5 ou Biosilicato®). Um dos defeitos ósseos de cada um dos hemi-arcos dentais ou não foi recoberto com nenhum material de preenchimento e serviu de controle ou foi preenchido com osso autógeno.

O retalho era então reposicionado coronariamente cobrindo o rebordo alveolar edêntulo e suturado com Vicryl[™] 4-0 (Ethicon Ltd – Brasil).

A distribuição dos materiais nos respectivos alvéolos variou em cada um dos animais, de modo que cada um dos materiais avaliados ocupasse cada uma das três posições possíveis, nas quais foram colocados os implantes.

FIGURA 1. Esquema mostrando a área de preenchimento dos defeitos ósseos criados com os materiais de preenchimento a serem avaliados (Biosilicato®, Biovidro 45S5) ou com enxerto de osso autógeno

FIGURA 2. Esquema mostrando o modelo de defeito ósseo criado mecanicamente na mandíbula de cães (M= mesial região de canino)

O recobrimento dos defeitos ósseos seguiu o seguinte protocolo:

Materiais utilizados:

1. Controle sem a colocação de nenhum material
2. Osso autógeno
3. Biovidro 45S5
4. Biosilicato®

Animal 1

Lado direito: materiais 1 2 3 Lado esquerdo: materiais 4 1 2

Animal 2

Lado direito: materiais 3 4 1 Lado esquerdo: materiais 2 3 4

Animal 3

Lado direito: materiais 2 3 4 Lado esquerdo: materiais 3 4 1

Animal 4

Lado direito: materiais 4 1 2 Lado esquerdo: materiais 3 4 1

Animal 5

Lado direito: materiais 2 3 4 Lado esquerdo: materiais 1 2 3

Assim procedendo, ao final do experimento temos 7 amostras do grupo controle sem qualquer preenchimento da área dos defeitos ósseos, 7

amostras de defeitos ósseos preenchidos com osso autógeno, 8 amostras preenchidas com Biovidro 45S5 e 8 amostras preenchidas com Biosilicato®.

Durante a fase de reversão da anestesia, foi aplicada uma dose de tramadol 1 a 2 mg/Kg de peso por via intramuscular visando o controle da dor nas primeiras 12 horas de pós-operatório. Decorrido este período, o controle da dor era feito empregando meloxicam 0,2% (0,2 mg de meloxicam por Kg de peso corporal) a cada 24 horas durante 3 dias, por via subcutânea. Caso fosse necessário a remediação era feita com dipirona sódica 25 mg/Kg, administrada por via subcutânea.

Durante o período de recuperação da anestesia, até que o animal tivesse recobrado parcialmente os reflexos, ele era mantido na sala cirúrgica sendo então transportado para uma sala própria de recuperação onde permanecia cerca de 18 horas, até o dia seguinte. Daí, ele era transportado para o canil do biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, onde permaneceu durante todo o período experimental com fornecimento de água e ração (Capeto – FriPet S.A., Pitangueira- SP, Brasil) *ad libitum*.

Nos primeiros 10 dias do período pós-operatório os animais foram monitorados diariamente e as feridas inspecionadas a cada 3 dias visando detectar sinais clínicos de complicações ou reações adversas, bem como para monitorar o processo de cicatrização da ferida cirúrgica. Durante os primeiros 14 dias os cães foram mantidos com dieta pastosa.

OBTENÇÃO DO ENXERTO DE OSSO AUTÓGENO

Um bloco de osso autógeno cortical com dimensões aproximadas de 10X10X5mm era obtido do ramo ascendente da mandíbula de um dos lados,

por meio do emprego de uma broca 701 acionada por motor elétrico em baixa rotação sob irrigação abundante e constante com solução fisiológica a 0,9%. O material obtido era imediatamente particulado utilizando-se um particulador próprio de osso (Neodent®) e condensado no respectivo defeito ósseo preenchendo-o.

MORTE DOS ANIMAIS

Os animais foram mortos empregando-se cloreto de potássio, administrado por via endovenosa, 18 semanas após a colocação dos implantes.

Os animais no dia da morte encontravam-se em perfeitas condições de saúde, sem sinais clínicos de doenças crônicas ou aguda, tendo sido examinados por um médico veterinário, que assistiu o procedimento.

Foi utilizado o protocolo de anestesia padrão. Inicialmente o cão foi sedado com acepromazina (0,1 mg/Kg de peso corporal) administrada por via intramuscular. Após 10 minutos foi anestesiado com propofol na proporção de 0,5 ml por kg/peso e entubado com sonda orotraqueal número 9. Com o animal anestesiado foi aplicado um cateter em seu membro torácico direito utilizando a veia cefálica para infusão de solução fisiológica a 0,9%.

Após constatarem-se sinais clínicos que evidenciassem anestesia profunda do animal foi aplicado no interior do recipiente de solução fisiológica cloreto de potássio diluído em água destilada (1mg/Kg de peso corporal). Após alguns minutos, realizados exames clínicos e constatado que o cão apresentava parada cardiorrespiratória e não mais possuía estímulos compatíveis com a vida, ele foi dado como morto pelo médico veterinário.

Após a morte do animal a mandíbula foi removida utilizando serra, preservando-se os tecidos (figura 3), e a hemi-arcada foi examinada clinicamente.

FIGURA 3 – (A) Hemi arcada mandibular contendo os implantes colocados; (B) Peça seccionada pronta pra ser radiografada

Foram realizadas radiografias periapicais da peça removida a fim de facilitar a localização dos implantes (figura 4).

FIGURA 4 – (A) Radiografia periapical da área contendo os implantes; (B) Radiografia do bloco de resina contendo o implante

Após a avaliação radiográfica a hemi-arcada foi novamente seccionada em três partes, cada uma delas contendo um implante (figura 5).

FIGURA 5 – Peça seccionada contendo o implante

AVALIAÇÃO CLÍNICA

Após a morte dos animais a superfície vestibular das hemimandíbulas na área dos implantes era avaliada clinicamente.

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Cada uma das peças obtidas das hemi-arcadas foi dissecada e fixada em solução de formalina a 10% com pH 7 por 10 dias, a qual foi trocada a cada 2 dias. Decorrido este prazo as peças foram transferidas para uma solução de álcool a 70% vv até seu processamento.

As amostras obtidas, acondicionadas em recipientes próprios, foram desidratadas em soluções crescentes de álcool (70% vv a 100%). Elas permaneceram por 48 horas em cada uma das concentrações (70%, 80%, 96%) e por 96 horas em álcool a 100%, sendo trocada a solução após decorridas 48 horas. A cada troca as amostras foram submetidas à agitação durante 4 horas. As amostras desidratadas foram colocadas em recipientes de polietileno contendo resina pura (LR White Hard Grade, London, UK) e mantidas sob agitação por 60 minutos (figura 6-A). Posteriormente, os espécimes foram armazenados e mantidos por 12 a 18 horas em refrigerador a

4°C. Decorrido este prazo, as peças foram mantidas no vácuo por uma hora (figura 6-B), agitadas por igual tempo e novamente armazenadas em refrigerador a 4°C por 24 horas.

FIGURA 6 – (A) Agitador empregado; (B) Aparelho de vácuo

Esta rotina foi repetida por nove dias, trocando-se a resina a cada 48 horas. No décimo dia, após a troca da resina, as peças foram incluídas em moldes de teflon preparados para este fim, e devidamente identificadas foram levadas ao forno a 60°C por 12 a 18 horas, para que ocorresse a polimerização da resina. O tempo de polimerização e a temperatura são fundamentais para as características físicas dos blocos. As amostras processadas dessa forma permitem uma perfeita infiltração da resina e os blocos tornam-se duros, transparentes e podem ser cortados facilmente.

Os blocos de resina polimerizada contendo as amostras foram cortados ao meio em micrótomo¹ no sentido vestibulo lingual utilizando lâmina diamantada², sob velocidade constante (130 RPM) e irrigação abundante e contínua com etileno glicol.

¹ Microslice 2 – Ultratec Manufacturing, Inc., Santa Ana-USA

² Intensiv S.A – Swiss Dental Diamont, Grancia, Suíça

FIGURA 7 – (A) Micrótomo; (B) Aspecto do bloco de resina cortado ao meio; (C) Aspecto do bloco de resina contendo o implante.

As superfícies contendo o implante foram desgastadas manualmente utilizando discos de feltro de carbureto de silício com grana 600, 1200 e 2400 e polidas manualmente com discos de feltro e abrasivo óxido de alumínio de diferentes granulações (0,3 μm e 0,05 μm) até a superfície da peça ficar lisa (figura 8).

FIGURA 8 – Discos de feltro de carbureto de silício

Os blocos lixados e polidos foram colados a uma lâmina de vidro por meio de cola Loctite® LI 1210, que é usada exclusivamente para o equipamento câmara de colagem ultra violeta Loctite® Zeta 7610 UV Benchtop

Conveyor (figura 9), e o conjunto foi colado a um braço móvel do micrótomo por meio do emprego de uma cera específica composta por cera de abelha e breu para ser cortado com espessura aproximada de 40 μm .

FIGURA 9 – Equipamento para câmara de colagem Loctite® Zeta 7610 UV Benchtop Conveyor

A superfície exposta da peça colada à lâmina foi novamente lixada e polida até a obtenção de espessura aproximada de 30 μm . Em seguida a lâmina foi submetidas à coloração com azul de *Stevenel* e vermelho de Alizarina, conforme descrito por Maniatopoulos *et al.* (1986). A fim de proteger o corte as lâminas obtidas receberam laminulas, foram identificadas e assim preparadas foram examinadas em microscópio de luz (Jenaval, Carl Zeiss - Jena, Germany).

FIGURA 10 – Aspecto da lâmina preparada e do corte obtido.

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Foi feita uma análise descritiva das áreas observadas avaliando-se a reação tecidual, neoformação óssea, características do tecido ósseo encontrado e a presença ou ausência dos materiais utilizados no recobrimento do defeito ósseo criado.

ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

A análise histomorfométrica foi realizada utilizando microscópio de luz acoplado a uma videocâmara que capta a imagem para um computador. Empregando um programa de computador de domínio público (Image J) foi avaliada a quantidade de osso em contato com o implante (COI), que foi expressa como a porcentagem do perímetro total entre quatro roscas, a partir da primeira rosca cervical completa em direção ao ápice do implante até a quarta rosca.

FIGURA 11 - Fotomicrografia demonstrando a região do implante onde foi realizada a medida do contato osso-implante. (Aumento 5 vezes).

Foi avaliada também a porcentagem de tecido mineralizado presente entre as quatro roscas (OMER), assim como a quantidade de tecido mineralizado na área em espelho (OMAE). Área em espelho é definida como uma área simétrica ao trapézio formado entre duas roscas consecutivas, compartilhando a maior base do trapézio (Rosa *et al.*, 2006).

FIGURA 12 – Fotomicrografia esquematizando a área adjacente e distante (em espelho) da superfície do implante, onde foram realizadas as medidas de densidade óssea. (Aumento 5 vezes).

Essas análises foram realizadas por um único examinador, seguindo um procedimento “cego”, pois assim ele não sabia a qual grupo o material examinado pertencia. Cada uma das medidas foi realizada três vezes, considerando como percentual de contato osso implante (COI) ou densidade óssea (OMER, OMAE) a média aritmética obtida dessas medidas.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram agrupados utilizando os implantes e os cães como unidades para análise em média e desvio padrão e foram testados em relação ao nível de normalidade, utilizando o programa GMC – 2002. Posteriormente, os dados foram analisados por meio do emprego do teste Kruskal Wallis utilizando nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Durante o período pós-operatório das extrações dentais não foram observadas complicações cirúrgicas ou reações adversas, e os locais das extrações dentais encontravam-se fechados e sem qualquer sinal de infecção quando da realização dos defeitos ósseos e colocação dos implantes.

No momento da morte, os cães encontravam-se em perfeitas condições de saúde, sem sinais clínicos de doenças crônicas ou agudas, e clinicamente as áreas contendo os implantes encontravam-se normais com a mucosa bucal com coloração e textura normais, sem qualquer sinal que indicasse exposição da ferida cirúrgica ou infecção. Aparentemente foram mantidas as dimensões do tecido ósseo ao redor dos implantes e nenhuma rosca do implante encontrava-se exposta ao meio bucal. Em apenas um cão ocorreu a exposição do parafuso de cobertura duas semanas após a sua colocação sem, no entanto, ocorrer a exposição do material testado colocado naquele sítio. Notou-se também que em nenhuma das lâminas histológicas analisadas ocorreu exposição do implante ao meio bucal.

O epitélio de revestimento que recobria a área dos implantes encontrava-se íntegro e sem qualquer solução de continuidade (figura 13).

FIGURA 13 - (A) Aspecto clínico e (B) histológico do implante 18 semanas após ter sido colocado evidenciando a integridade da mucosa bucal recobrindo o implante.

Cabe ressaltar que no preparo das peças para individualização dos implantes foi necessário a remoção de parte do epitélio de revestimento sobre o parafuso de cobertura dos implantes para a correta localização e corte dos mesmos.

ANÁLISE HISTOLÓGICA

Em razão de não haver evidências da presença de fragmentos de osso autógeno nos preparados histológicos do grupo experimental correspondente, os aspectos histológicos relativos a esse grupo e àquele em que não foi colocado qualquer material serão descritos conjuntamente.

GRUPOS CONTROLES: SEM COLOCAÇÃO DE MATERIAL E COM A COLOCAÇÃO DE OSSO AUTÓGENO

Respostas histológicas semelhantes foram observadas nos grupos controles sem a colocação de enxertos e naquele em que foi utilizado osso autógeno como preenchimento. Após o período experimental não foram observados resíduos de osso autógeno.

Nestes grupos foi observado neoformação óssea com deposição de osso lamelar adjacente às roscas dos implantes, por vezes em direto contato com a superfície metálica, organizado em lamelas concêntricas de novos sistemas de Havers e em lamelas paralelas entre si (figuras 14 e 15). A matriz mineralizada, corada por vermelho de Alizarina, era revestida ora por células de revestimento ósseo ora por osteoblastos com aspectos morfológicos

de células ativas. Lacunas na matriz óssea eram ocupadas por osteócitos, enquanto canais de alimentação continham tecido conjuntivo com vasos sanguíneos. Eram raras as lacunas de Howship contendo osteoclastos. A neoformação óssea ocorreu do ápice do implante em direção à sua plataforma. Não se observou infiltrado inflamatório. Em nenhuma das lâminas analisadas observou-se o preenchimento de toda a área do defeito ósseo. Externamente ao periósteo, observavam-se feixes de fibras musculares estriadas esqueléticas (figura 16).

Figura 14 – Aspecto histológico do implante do grupo controle sem qualquer material de preenchimento do defeito ósseo evidenciando ausência de contato direto neste plano de corte entre o osso e o implante e discreta formação óssea (aumento 10 vezes).

FIGURA 15 - Aspecto histológico do implante 18 semanas após ter sido colocado, no grupo em que não foi colocado nenhum material recobrindo o defeito ósseo (aumento 5 vezes).

FIGURA 16 - Aspecto histológico do implante 18 semanas após ter sido colocado, no grupo em que o defeito ósseo foi recoberto com osso autógeno (aumento 5 vezes).

GRUPO COM COLOCAÇÃO DE BIOVIDRO 45S5 (Bioglass®)

A análise das lâminas evidenciava a presença de partículas de Biovidro 45S5 em quantidades variáveis, com a presença de matriz mineralizada compatível com matriz óssea corada por vermelho de Alizarina em sua superfície parcialmente degradada e envolvida por matriz colágena densa corada por azul de Stevenel (figura 17 B). Essas formações teciduais contendo partículas do Biovidro 45S5 não estabeleciam contato direto com a superfície metálica do implante e impediam a reorganização do tecido muscular próximo ao implante. Constatou-se também a neoformação óssea do ápice do implante em direção à sua plataforma, que em algumas áreas ocorria em contato direto com a superfície do implante (figura 17 A).

FIGURA 17 - (A) Aspecto histológico do implante 18 semanas após ter sido colocado, no grupo em que o defeito ósseo foi recoberto com Biovidro 45S5. (aumento 5 vezes). (B) Aspecto histológico de partícula de Biovidro 45S5 parcialmente degradada contendo em seu interior material compatível com matriz óssea envolvida por matriz colágena densa (aumento 20 vezes).

GRUPO COM COLOCAÇÃO DE BIOSILICATO®

A análise das lâminas evidenciava a presença de partículas de Biosilicato® em quantidades variáveis, parcialmente degradadas e envolvidas por matriz colágena densa (figura 18 A e B) corada em azul de Stevenel. Não foi observado contato direto entre as partículas do Biosilicato e a superfície do implante. Neoformação óssea ocorreu do ápice do implante em direção à sua plataforma, em alguns pontos em contato direto com a superfície metálica (figura 18 A). Células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho eram observadas em contato direto com superfícies da partícula (figura 18 B).

FIGURA 18 - (A) Aspecto histológico do implante 18 semanas após ter sido colocado, no grupo em que o defeito ósseo foi recoberto com Biosilicato® (aumento 5 vezes). (B) Aspecto histológico de partícula de Biosilicato® parcialmente degradada contendo em seu interior material compatível com matriz mineralizada e em sua superfície externa, células gigantes

multinucleadas tipo corpo estranho, coradas em azul escuro (aumento 20 vezes).

Em uma das lâminas avaliadas constatou-se reabsorção óssea na superfície vestibular na área do defeito ósseo expondo roscas anteriormente recobertas por tecido ósseo (figura 19).

Figura 19 – Aspecto histológico do implante 18 semanas após sua colocação, já fixado na lâmina evidenciando reabsorção óssea na superfície vestibular (V) do implante.

A porcentagem média de contato direto entre a superfície do implante e o tecido ósseo neoformado encontra-se na tabela 1 e na figura 20. Os dados referentes à porcentagem de contato diretos osso/implante foram agrupados de acordo com o grupo experimental, desconsiderando a posição ocupada na mandíbula.

Tabela 1 – Porcentagem média de matriz mineralizada em contato direto com a superfície do implante. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n= 5).

Amostra	Biosilicato®	Biovidro 45S5	Autógeno	Controle
	22,14 $\pm$ 20,95	13,39 $\pm$ 8,60	16,37 $\pm$ 15,43	18,14 $\pm$ 23,46

Figura 20 - Porcentagem média de matriz mineralizada em contato direto com a superfície do implante. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n= 5).

A porcentagem média de densidade óssea na área adjacente às roscas encontra-se na tabela 2 e na figura 21. Todo dado referente à densidade óssea foi agrupado de acordo com o grupo experimental, desconsiderando a posição ocupada na mandíbula.

Tabela 2 – Porcentagem média da densidade óssea na área adjacente às roscas. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n= 5).

Amostra	Biosilicato®	Biovidro 45S5	Autógeno	Controle
	31,50 $\pm$ 22,09	26,60 $\pm$ 12,45	42,45 $\pm$ 22,48	34,32 $\pm$ 23,96

Figura 21 - Porcentagem média da densidade óssea na área adjacente às roscas. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n= 5).

A porcentagem média de densidade óssea na área distante (área em espelho) das roscas encontra-se na tabela 3 e na figura 22. Todo dado referente à densidade óssea foi agrupado de acordo com o grupo experimental, desconsiderando a posição ocupada na mandíbula.

Tabela 3 – Porcentagem média da densidade óssea na área distante (área em espelho) das roscas. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n= 5).

Amostra	Biosilicato®	Biovidro 45S5	Autógeno	Controle
	29,87 $\pm$ 22,51	30,30 $\pm$ 1,71	43,00 $\pm$ 29,46	29,07 $\pm$ 21,43

Figura 22 - Porcentagem média da densidade óssea na área distante (área em espelho) das roscas. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n= 5).

DISCUSSÃO

O presente estudo visou avaliar clínica, histológica e histomorfometricamente a interface formada com a colocação de biomateriais ou osso autógeno em defeitos ósseos produzidos em mandíbulas de cães após a colocação de implantes.

As observações clínicas evidenciaram que os defeitos ósseos apresentavam dimensões semelhantes, e que em todos os casos avaliados ocorreu a exposição de quatro roscas do implante.

Deve ser ressaltado que nos experimentos *in vivo* a interpretação da morfologia da interface implante/osso deve considerar as dificuldades encontradas para mantê-la intacta durante o processamento histológico das peças. A fixação, desidratação e a embebição dos espécimes incluem problemas inerentes ao processamento, como incompleta fixação ou desidratação, incompleta penetração da resina ou ainda a incompleta polimerização nessa interface (Liporaci Junior, 2006). A resposta biológica após a colocação de implantes é modulada por diversos fatores, entre os quais, a espécie animal empregada, o local da implantação, as características do biomaterial como o grau de solubilidade apresentado.

Deve ser enfatizado que a criação de defeitos cirúrgicos bucais padronizados tipo deiscência em cães, freqüentemente têm sido empregados para avaliar regeneração óssea adjacente a implantes de titânio (Casati *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2003).

Os resultados histológicos observados evidenciaram que a reparação óssea na área do defeito ósseo produzido mecanicamente foi incompleta. A neoformação óssea na área do defeito ósseo ocorreu da porção apical do defeito em direção ao rebordo alveolar. Botticelli *et al* (2003) sugerem

que a reparação de defeitos ósseos marginais ao redor de implante é caracterizada por neoformação óssea aposicional contínua das paredes ósseas laterais e apical do defeito em direção coronal, e o contato osso/implante é inicialmente estabelecido na região apical do defeito.

O Biosilicato[®], assim como o Biovidro 45S5 mostraram-se biocompatíveis quando colocados em defeitos ósseos como substitutos ósseos.

O preenchimento dos defeitos ósseos utilizando Biosilicato[®], Biovidro 45S5 (Bioglass) ou mesmo osso autógeno particulado não favoreceu a reparação óssea, pois não há diferença estatisticamente significativa na quantidade de osso formado nas áreas preenchidas com esses materiais ou mesmo no controle em que nenhum material foi colocado. Durante o emprego dos biomateriais ficou evidenciado um manuseio mais fácil do Biovidro 45S5 devido à formação de uma massa coesiva quando em contato com fluídos orgânicos, além do efeito hemostático.

Os resultados histológicos observados evidenciam que nos quatro tratamentos avaliados, isto é, defeito ósseo preenchido com Biosilicato[®], Biovidro 45S5, osso autógeno ou coágulo sanguíneo, a interface implante/tecido neoformado mostrou-se de forma semelhante, não tendo evidenciado diferença significativa em qualquer dos parâmetros empregados. Não foi constatada partículas dos biomateriais avaliados (Biosilicato[®], Biovidro 45S5) em contato direto com a superfície do implante de titânio.

O contato direto osso/implante (COI) variou de $13,39 \pm 8,60\%$ no grupo preenchido com osso autógeno a $22,14 \pm 20,95\%$ no grupo em que o defeito foi preenchido com o Biosilicato[®]. No grupo em que o defeito não foi

preenchido com nenhum material a média de contato osso/implante foi de $18,14 \pm 23,46\%$. Embora não tenha sido constatada diferença estatisticamente significativa entre os índices de contato osso/implante entre os materiais avaliados e o controle sem qualquer material, eles apareceram na seguinte ordem: Biosilicato® > controle sem material > osso autógeno > Biovidro 45S5.

Moura *et al.* (2007) constataram *in vitro* que o Biosilicato® 100% cristalino pode promover um aumento da formação de matriz mineralizada em sistema de cultura de células, pois este biomaterial promoveu aumento significativo no potencial osteogênico de células derivadas da calvária de ratos. A cristalização total do Biosilicato pode alterar importantes propriedades do material, entre as quais o índice de dissolução. Tais alterações podem alterar o pH do meio tornando-o alcalino favorecendo a diferenciação e a função osteoblástica (Xynos *et al.*, 2000; Loty *et al.*, 2001).

A excessiva solubilidade do material pode dificultar a precipitação de cristais de apatita e a formação de cristais de apatita e a formação óssea na superfície do implante (Daculsi *et al.*, 1990). Cabe ressaltar que a solubilidade do Biosilicato® não foi avaliada nesse estudo. É possível que a redução da solubilidade do material possa melhorar a resposta biológica. O Biosilicato® que foi avaliado mostrou comportamento semelhante ao do Biovidro 45S5, considerado um enxerto de qualidade comprovada.

Uma possível explicação para os baixos índices de contato osso/implante pode ser o modelo experimental empregado e o tamanho do defeito ósseo adotado.

Embora o tamanho das partículas de Biovidro 45S5 empregadas no recobrimento do defeito ósseo criado na superfície vestibular da mandíbula

varie de 300 a 350 μm , o que favoreceria a regeneração óssea (Shepers *et al.*, 1993), tal fato não ocorreu. Entretanto, pode ser evidenciada a presença de matriz mineralizada no interior das partículas, conforme citação desses autores.

Furusawa *et al.*(1997) relataram que a bioatividade dos biovidros, em especial do Bioglass® está relacionada à uniformidade do tamanho das partículas, pois partículas com tamanho inferior a 200 μm são absorvidas rapidamente, podendo provocar reação inflamatória, enquanto partículas maiores que 400 μm podem permanecer inertes e não serem absorvidas, impedindo a formação óssea.

As partículas do Biosilicato® não pareciam apresentar um tamanho homogêneo como o Biovidro 45S5 empregado, mas segundo o fabricante encontravam-se dentro da faixa de 290 a 355 μm . Assim como ocorreu com o Biovidro 45S5 neste estudo, as partículas de Biosilicato® apresentavam matriz mineralizada em seu interior.

A avaliação histológica evidenciou um quadro muito semelhante no grupo em que foi empregado o Biosilicato®. Embora os resultados não evidenciem diferenças estatisticamente significantes entre os materiais de enxerto empregados, tanto o Biovidro 45S5 como o Biosilicato® mostraram bioatividade.

No grupo em que o defeito ósseo foi preenchido com osso autógeno, durante avaliação histológica não foi constatada a presença de partículas desse material, as quais possivelmente foram absorvidas pelo organismo.

Cumprе ressaltar que além do tamanho da partícula do material empregado, a proporção entre a superfície do implante e o volume local da

implantação deve ser considerada durante a interpretação de resultados avaliando regeneração óssea. No presente estudo, o grande tamanho do defeito ósseo produzido mecanicamente pode ter contribuído para os resultados observados.

A formação do coágulo na área do defeito, sua retenção e substituição com a formação de matriz óssea podem ter sido prejudicados pela presença dos materiais na região do implante, embora mesmo no grupo em que nenhum material foi colocado o índice de contato direto osso/implante foi muito baixo.

O coágulo sanguíneo basicamente atua como uma matriz física que induz e aumenta a migração, proliferação e diferenciação de vários tipos de células, subseqüentemente conduzindo a fibroplasia e angiogênese (Lang *et al.*, 2003). Assim, a estabilização do coágulo sanguíneo e a precoce angiogênese são considerados fatores importantes na cicatrização de feridas.

Ficou evidenciado em algumas lâminas o colapso da parede vestibular do retalho para o interior do defeito ósseo criado diminuindo ou eliminando o espaço a ser ocupada pelo coágulo, prejudicando desse modo a formação de matriz mineralizada. Talvez o emprego de membranas não maleáveis recobrando os enxertos colocados, ao não possibilitar o colapso do retalho vestibular para o interior do defeito ósseo pudessem favorecer a neoformação óssea. Teoricamente há o risco de que o emprego de membranas maleáveis possa provocar o colapso na superfície do implante resultando na redução ou eliminação do espaço disponível para o crescimento de tecidual (Stavropoulos *et al.* 2004). Além disso, a falta de estabilização da membrana

pode resultar na perda de adaptação favorecendo a invasão do tecido mole na área protegida pela membrana, prejudicando a reparação tecidual.

Embora no momento da colocação do implante tenha sido obtida uma estabilidade primária de no mínimo 45N. cm, em virtude de o defeito ósseo ser grande, comprometendo cerca de 6 mm do comprimento do implante na superfície vestibular, a estabilidade obtida inicialmente pode ter sido prejudicada, por ser obtida por apenas 3 mm.

A estabilidade do implante e a vascularização dos tecidos são dois importantes fatores que influenciam a reparação óssea (Carter *et al.* 1998). Células mesenquimais na interface do recém colocado implante são inevitavelmente submetidas a diferentes estresses. Devido a essas cargas serem freqüentemente intermitentes e incontroláveis, o estado biomecânico dos tecidos varia continuamente (Vandame *et al.* 2007).

A micro movimentação do implante durante a fase precoce de reparação óssea pode ser responsável pela falta de osseointegração (Jung *et al.*, 2007).

O emprego de enxertos de osso autógeno ou de biomateriais não impediram o contato direto entre osso e implante.

A reabsorção óssea evidenciada em uma das lâminas avaliadas pode ter ocorrido como resultado da manipulação mecânica do osso durante o preparo do defeito ósseo ou de um processo infeccioso, embora não tenham sido identificados elementos que comprovem nenhuma dessas duas hipóteses durante as avaliações clínicas realizadas no período pós-operatório e na data da morte do animal.

A hipótese possível da ocorrência de reabsorção óssea devida um excessivo aquecimento do tecido ósseo durante a confecção do defeito ósseo, que prejudicaria a reparação óssea não é sustentável, pois, os princípios de técnica cirúrgica foram respeitados, tanto na confecção do defeito ósseo como na realização das perfurações ósseas para a posterior colocação do implante. Além disso, uma vez que a mesma metodologia experimental foi adotada para todos os espécimes é pouco provável a ocorrência de reabsorção óssea em apenas um espécime.

Nesse estudo não foi observada diferença estatisticamente significativa nas porcentagens médias de densidade óssea na área

Embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa nas porcentagens médias de densidade óssea na área adjacente às roscas do implante, elas apareceram na seguinte ordem: osso autógeno > controle sem material > Biosilicato® > Biovidro 45S5. As porcentagens médias de densidade óssea na área distante das roscas obedeceram à seguinte ordem: osso autógeno > Biovidro 45S5 > Biosilicato® > controle sem material.

Os resultados observados no presente trabalho são semelhantes aos relatados por Roriz (2006), que constataram que tanto o Biovidro 45S5 quanto o Biosilicato® parecem ser uma alternativa viável e segura quando se deseja regeneração óssea prévia à colocação de implantes osseointegráveis. Esta afirmação pode ser reforçada considerando-se que não ocorreu diferença na resposta biológica ao se empregar osso autógeno, Biovidro 45S5 ou Biosilicato®, bem como devido ao fato de que o emprego desses biovidros não exige nenhum procedimento cirúrgico adicional e não apresenta limitação de quantidade de material, o que não ocorre com o osso autógeno.

Cabe ressaltar que os resultados observados no presente trabalho não devem ser transferidos diretamente para a espécie humana, visto que no modelo experimental empregado há diferenças tanto no metabolismo celular como na velocidade de remodelação óssea.

CONCLUSÕES

A análise dos resultados observados permite concluir:

O Biosilicato® e o Biovidro 45S5 avaliados mostraram ser viáveis para serem empregados na clínica de implantes como substitutos ósseos.

O Biosilicato® e o Biovidro 45S5 avaliados mostraram bioatividade e apresentaram biocompatibilidade semelhante *in vivo*.

A formação de matriz óssea mineralizada parece não ter sido favorecida no modelo experimental empregado com o preenchimento do defeito ósseo com Biosilicato® ou Biovidro 45S5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01.AXHAUSEN, W. The osteogenetic phases of regeneration of bone; a historial and experimental study. **J Bone Joint Surg Am.** v. 38-A, n.3, p.593-600. Jun 1956.
- 02.BOTTICELLI, D.; BERGLUNDH, T.; BUSER, D.; LINDHE J. Appositional bone formation in marginal defects at implants. **Clin Oral Implants Res.** v. 14, n. 1, p. 1-9. Feb 2003.
- 03.BOYNE, P. J. Current developments with growth factors and bone proteins. **Dent Implantol Update.** v.10, n. 4, p. 25-27. Apr 1999.
- 04.CARTER, D. R.; BEAUPRÉ, G. S.; GIORI, N. J.; HELMS, J. A. Mechanobiology of skeletal regeneration. **Clin Orthop Relat Res.** v. 355, p.41-55. Oct. 1998.
- 05.CASATI, M. Z.; SALLUM, E. A.; NOCITI, F. H. JR.; CAFFESSE, R. G.; SALLUM, A.W. Enamel matrix derivative and bone healing after guided bone regeneration in dehiscence-type defects around implants. A histomorphometric study in dogs. **J Periodontol.** v.73, n. 7, p. 789-796. Jul 2002.
- 06.DA ROCHA BARROS, V.M.; LIPORACI, J.L. JR.; ROSA, A.L.; JUNQUEIRA, M.C.; DE OLIVEIRA, P.T.; JOHNSON, A.; VAN NOORT, R. Bone response to three different chemical compositions of fluorcanasite glass-ceramic. **J Biomed Mater Res A.**v.83, n. 2, p. 480-483. Nov 2007.
- 07.DACULSI, G.; PASSUTI, N. Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. **Biomaterials.** v.11 p.86-87. Jul 1990.
- 08.DIEUDONNÉ, S. C.; VAN DEN DOLDER, J.; DE RUIJTER, J. E.; PALDAN, H.; PELTOLA, T.; VAN 'T HOF, M. A.; HAPPONEN, R. P.; JANSEN, J. A.

Osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells cultured on silica gel and sol-gel-derived titania. **Biomaterials**. v. 23, n. 14, p. 3041-3051. Jul 2002.

09.DUCHEYNE, P.; QIU, Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. **Biomaterials**. v. 20, n. 23-24, p.2287-2303. Dec 1999.

10.FINI, M.; NICOLI ALDINI, N.; GANDOLFI, M. G.; MATTIOLI BELMONTE, M.; GIAVARESI, G.; ZUCCHINI, C.; DE BENEDITTIS, A.; AMATI, S.; RAVAGLIOLI, A.; KRAYEWSKI, A.; ROCCA M.; GUZZARDELLA, G.A.; BIAGINI, G.; GIARDINO, R. Biomaterials for orthopedic surgery in osteoporotic bone: a comparative study in osteopenic rats. **Int J Artif Organs**. v.20, n.5, p.291-297. May. 1997.

11.FURUSAWA, T.; MIZUNUMA, K. Osteoconductive properties and efficacy of resorbable bioactive glass as a bone-grafting material. **Implant Dent.**, v. 6, n. 2, p. 93-101. Summer 1997.

12.HENCH, L. L. Ceramics, glasses, and composites in medicine. **Medical Instrumentation**, Arlington, v. 7, n. 2, p.136-144. Mar./Apr. 1973.

13.JOHNSON, M. W.; SULLIVAN, S. M.; ROHRER, M.; COLLIER, M. Regeneration of peri-implant infrabony defects using PerioGlas: a pilot study in rabbits. **Int J Oral Maxillofac Implants**. Lombard, v. 12, n. 6 , p. 835-839. Nov./Dec. 1997.

14.JUNG, U. W.; KIM, C. S.; CHOI, S. H.; CHO, K. S.; INOUE, T.; KIM, C. K. Healing of surgically created circumferential gap around non-submerged-type implants in dogs: a histomorphometric study. **Clin Oral Implants Res**. v. 18, n. 2, p. 171-178. Apr. 2007.

- 15.LANG, N.P.; ARAUJO, M.; KARRING, T. Alveolar bone formation. **Clinical Periodontology and Implants Dentistry**. 4th edition, p. 866-896. Blackwell Munksgaard, Oxford, UK.
- 16.LOTY, C.; SAUTIER, J. M.; TAN, M. T.; OBOEUF, M.; JALLOT, E.; BOULEKBACHE, H.; GREENSPAN, D.; FOREST, N. Bioactive glass stimulates in vitro osteoblast differentiation and creates a favorable template for bone tissue formation. **J Bone Miner Res**. v.16, n. 2, p.231-239. Feb 2001.
- 17.MELLONIG, J. T.; NEVINS, M. Guided bone regeneration of bone defects associated with implants: an evidence-based outcome assessment. **Int J Periodontics Restorative Dent**.; v. 15, n. 2, p.168-185. Apr 1995.
- 18.MOORE, W. R.; GRAVES, S. E.; BAIN, G. I. Synthetic bone graft substitutes. **ANZ J Surg**. v. 71, n. 6, p. 354-361. Jun. 2001.
- 19.MOURA, J.; TEIXEIRA L. N.; RAVAGNANI, C.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D.; BELOTI, M. M.; PANZERI, H.; ROSA, A. L.; DE OLIVEIRA, P.T. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate), **J Biomed Mater Res A**. v.182 ,n.3, p.545-557. Sep. 2007.
- 20.OH T. J.; YOON, J.; MERAW, S. J.; GIANNOBILE, W. V.; WANG, H. L. Healing and osseointegration of submerged microtextured oral implants. **Clin Oral Implants Res**. v. 14, n. 5, p. 643-650. Oct.2003.
- 21.OONISHI, H.; HENCH, L.L.; WILSON, J.; SUGIHARA, F.; TSUJI, E.; KUSHITANI, S.; IWAKI, H. Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. **J Biomed Mater Res**. v. 44, n. 1, p. 31-43. Jan 1999.
- 22.PAPALEXIOU, V.; NOVAES, A.B. JR.; GRISI, M. F., SOUZA, S. S.; TABA, M. JR.; KAJIWARA, J.K. Influence of implant microstructure on the dynamics of

bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites. A confocal laser scanning microscopic study. **Clin Oral Implants Res.** v. 15, n.1, p. 44-53. Feb 2004.

23. PEITL, O.; ZANOTTO, E. D.; HENCH, L. L. Highly bioactive P_2O_5 - Na_2O - CaO - SiO_2 glass-ceramics. **Journal of Non-Crystalline Solids.** v. 292, p. 115-126. Jul. 2001.

24. PEITL FILHO, O.; LATORRE, G. P.; HENCH, L. L.. Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5. **J Biomed Mater Res.**; v. 30, n. 4 p. 509-514. Apr, 1996.

25. RIVAULT, A. F.; TOTO, P. D.; LEVY, S.; GARGIULO, A. W. Autogenous bone grafts: osseous coagulum and osseous retrograde procedures in primates. **J Periodontol.**; v.42, n.12, p.787-796. Dec 1971.

26. RORIZ, V. M. Avaliação clínica, histológica de alvéolos dentários de cães preenchidos com biovidro ou Biosilicato, que posteriormente receberam implantes osseointegráveis. 2006. 105f. **Tese** (Doutorado em Odontologia)- Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

27. SCHEPERS, E.; DE CLERCQ, M.; DUCHEYNE, P.; KEMPENEERS, R. Bioactive glass particulate materials a filler for bone lesions. **J Oral Rehabil.** Oxford, v.18, n. 5, p. 439-452. Sep. 1991.

28. SCHEPERS, E. J.; DUCHEYNE P.; BARBIER, L.; SCHEPERS, S. Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. **Implant Dentistry**, Baltimore, v. 2, n. 3, p. 151-156. Fall. 1993.

29. SCHEPERS, E. J.; DUCHEYNE, P.; Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with

several materials and particle sizes and size ranges. **J Oral Rehabil.** v.24, n.3, p.171-181. Mar 1997.

30.SCHEPERS, E.; BARBIER, L.; DUCHEYNE, P. Implant placement enhanced by bioactive glass particles of narrow size range. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 13, n. 5, p. 655-665. Sep./Oct. 1998.

31.SHAPOFF, C. A.; ALEXANDER, D. C.; CLARK, A. E. Clinical use of a bioactive glass particulate in the treatment of human osseous defects. **Compend Contin Educ Dent.**, Lawrenceville, v.18, n.4, p.352-358. Apr.1997.

32.STAVROPOULOS, A.; SCULEAN, A.; KARRING, T. GTR treatment of intrabony defects with PLA/PGA copolymer or collagen bioresorbable membranes in combination with deproteinized bovine bone (Bio-Oss). **Clin Oral Investig.**, v.8, n.4, p.226-232. Epub Aug 3. 2004.

33.STENTZ, W. C; MEALEY, B. L; GUNSOLLEY, J. C. WALDROP, T. C. Effects of guided bone regeneration around commercially pure titanium and hydroxyapatite-coated dental implants. II. Histologic analysis. **J Periodontol.** v. 68, n.10, p. 933-949. Oct 1997.

34.VANDAMME, K.; NAERT, I.; GERIS, L.; SLOTEN, J. V.; PUERS, R.; DUYCK, J. Histodynamics of bone tissue formation around immediately loaded cylindrical implants in the rabbit. **Clin Oral Implants Res.** v. 18, n. 4, p. 471-480. May 2007.

35.VILLAÇA, J. H.; NOVAES, A.B. JR.; SOUZA, S. L.; TABA, M. JR.; MOLINA, G.O.; CARVALHO, T. L. Bioactive glass efficacy in the periodontal healing of intrabony defects in monkeys. **Braz Dent J.** v. 16, n. 1, p. 67-74. Aug 17, Epub 2005.

- 36.WACHTEL, H. C.; Treatment of furcation involvement--implantation of alloplastic materials, **Dtsch Zahnarztl Z.**; v.46, n.6, p.394-399. Jun 1991.
- 37.WILSON, J.; CLARK, A.E.; HALL, M.; HENCH, L.L. Tissue response to Bioglass endosseous ridge maintenance implants. **J Oral Implantol.** v. 19, n. 4, p. 295-302. 1993.
- 38.XYNOS, I. D.; HUKKANEN, M. V.; BATTEN, J. J.; BUTTERY, L. D.; HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering. **Calcif Tissue Int.** v. 67, n. 4, p.321-329. Oct 2000.
- 39.ZANOTTO, E. D., "Glass Myths". Frontiers in Materials Research / **Abstracts Viña del Mar**, Chile, p. 26-29. April 2004.
- 40.ZANOTTO, E. D.; RAVAGNANI, C.; PEITL, O.; PANZERI, H.; LARA, E. H. Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments, WO2004/074199, **Fundação Universidade Federal de São Carlos; Universidade de São Paulo**, 20 Feb. 2004, Int. C. C03C10/00.

ANEXOS

Bone Formation on Ti Implants in Intra-Bony Defect Sites Filled with Different Bone Substitutes: Histomorphometric Analysis in Dogs

*Roberto de Oliveira Jabur, DDS**

Alexandre Elias Trivellato, DDS, PhD†

Valdemar Mallet da Rocha Barros, DDS, PhD§

Received from the Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

*Graduate Student, Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology.

†Assistant Professor, Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology.

§Full Professor, Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology.

This work was supported by The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil) and National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil).

Address correspondence and reprints requests to Dr Rocha Barros: Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. do Café, s/n, 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel. + 55 16 3602-4054 Fax: + 55 16 3633-0999. E-mail: vmbarros@forp.usp.br

Short title: Ti Implants in Bone Defects Filled with Biomaterials or Autografts

ABSTRACT

Purpose: The aim of the present study was to investigate the amount of bone formation on Ti implants in sites with intra-bony defects filled with different bone substitutes.

Materials and Methods: Mandibular premolars and first molars were extracted from 5 dogs, and after 12 weeks 3 implants were bilaterally placed in sites with

intra-bony defects and each implantation site randomly received the following treatment: Biosilicate[®], Bioglass[®] 45S5, autologous bone or no treatment. At 18 weeks after implantation, the hemi-mandibles containing the implants were removed and processed for morphological and histomorphometric analysis. Data were submitted to the non-parametric Kruskal-Wallis test.

Results: The histological sections of the 4 experimental groups exhibited mature bone tissue in contact with implants, but not related with bioactive glasses or autologous bone used. The percentage of bone-implant contact, mineralized bone matrix between implant threads, and mineralized bone matrix within mirror area in the treated or non-treated sites were not statistically different among the 4 experimental groups.

Conclusion: These results indicate that the presence of the bone substitutes evaluated here did not interfere with bone formation on Ti implants in sites with intra-bony defects. In addition, tissue response to Biosilicate[®] was similar to that of Bioglass[®] 45S5 and autologous bone.

Key Words: Titanium, Bone defects, Bioactive glass, Glass-ceramic, Bone formation, Histomorphometry.

Introduction

Osseointegrated titanium (Ti) implants represent a great leap forward and advancement in Dentistry due to its excellent bone tissue biocompatible characteristics,¹ and to the resistance of its composing materials to the forces they are usually submitted to. The use of dental implants requires adequate bone tissue thickness and, thus, the stability of the implant might be affected due to bone defects. Bone defects can be corrected with the use of

biomaterials, which may improve the aesthetics of the adjacent soft tissues and promote osseointegration.

Several biomaterials have been developed and used to fill bone defects as an attempt to cover and protect the exposed surfaces of osseointegrated implants and to be an alternative or replacement to autogenous bone. Bioactive glasses, initially described by Hench (1971),² has been employed as a filling material because of its biocompatibility, excellent tissue response and results have shown to be stable. The *in vivo* osteoconducting properties of bioactive glasses lead to the formation of a calcium-phosphate (Ca-P) layer that is similar to the mineral phase of natural bone tissue.^{3,4}

A number of studies have evaluated the use of bioactive glasses for bone defects and periodontal repair, showing that such material is biocompatible and supports the formation of new bone inside the defect and towards the implant surface.^{3,5-9} Schepers & Ducheyne (1997)⁶ evaluated bone repair in defects created in dog mandibles, which were filled with bioactive glasses from different compositions and different particle sizes. The authors concluded that the use of particle size ranging from 330 μm to 355 μm would be ideal because it favored osteoconduction and osteostimulation, by promoting the commitment of mesenchymal cells into the osteoblastic lineage in the osteogenic loci.

Recently, Zanotto et al. developed a fully crystalline glass-ceramic in the $\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ system (Biosilicate[®], PI 0300644-1).¹⁰ Contrary to what was expected about the decrease of the bioactivity level following the increase of the material's crystallinity, *in vitro* experiments demonstrated that Biosilicate[®] is highly bioactive and supports enhanced bone-like matrix formation compared

to its parent glass and to Bioglass® 45S5 in a calvaria-derived osteogenic cell culture model.¹¹

The aim of the present study was to evaluate histologically and histomorphometrically the repair of bone defects created in dog mandibles and filled with Biosilicate® or Bioglass® 45S5 prior to Ti implant placement.

Material and Methods

The use of animals for the present study was authorized by the ethics committee of the University of São Paulo. Five 30 kg-mongrel dogs were used. The dogs were pre-anesthetized with Acepromazin 0.2% – dosage ranged from 0.005 to 0.1mg/kg (Vabriela – Girardot, Brasília – DF, Brazil) – and anesthesia was induced with Buprenorfin, dosage ranged from 0.001 to 0.002mg/kg, and Propofol, dosage ranged from 4.6 to 6.0mk/kg (Cristália, Itapira, SP, Brazil). Orotracheal intubation was performed through which the animals received pure oxygen. Anesthesia was maintained with vaporized Isoflurane dosed from 1.5 to 2.5%.

First surgical stage

Local anesthesia was performed using 2% mepicavain with adrenalin at 1:100,000. Mucoperiosteal flaps were raised from the canine tooth to the second molar. The teeth were bucco-lingually sectioned to obtain full separation of the roots and were carefully extracted, so no damage to bone tissue would be incurred. Treatment post-exodontia was aveoloplasty, gingivoplasty, curettage, 0.9% saline solution irrigation and suture.

Second surgical stage

After 8 weeks, the same anesthetic procedures were repeated; mucoperiosteal flaps were raised exposing all buccal mandible bone tissue from the canine tooth to the second molar. The implant perforations were carried out according to manufacture's recommendations (Neodent™, Curitiba, PR, Brazil). Three bilateral sequential perforations were done (Figure 1). They were 10 mm away from the molar and from each other and their depth and width corresponded to the implant sizes (3.75 x 9.0mm). Using a 701 bur, a 6 mm-long groove was made from the alveolar crest, apically. Using a trimming carbide bur, the bone tissue was worn down to expose the previously done perforations and, thus, producing a 3.75 x 6.0 mm defect. After producing the defect, the implants were screwed in allowing 4 of its threads to remain exposed, because of the defected bone wall. Each of the bone defects was covered with one of the biomaterials tested (Biosilicate® or Bioglass® 45S5). As controls, one of the defects in each hemi-mandible was either filled with autogenous bone or left untreated. After 18 weeks, the dogs were sacrificed, their mandibles removed and, each one, half sectioned into three parts, yielding six distinct blocks; one for each implant. These blocks were then processed to produce the samples for microscopic analysis as described bellow.

Block biopsies were ground-sectioned for light microscopy. Briefly, immediately after harvesting, the block biopsies were immersed in 4% formalin solution buffered with 0.1 M sodium cacodylate solution (pH 7.3) for 48 hours and transferred to 70% ethanol solution, where they remained for 72 hours. After that, block biopsies were dehydrated in graded concentrations of ethanol

and embedded in resin (LR White Hard Grade, London, United Kingdom). Following polymerization, resin blocks were sectioned with a diamond knife (Microslice 2, Ultra Tec Manufacturing Inc., USA) to produce two longitudinal mesio-distal sections per implant. Each section was polished and mounted on glass slides, so that the resulting 40 μm -thick mounted sections could be further ground and polished to a thickness of 20 μm . Sections were then stained with Stevenel's blue and Alizarin red.

Histological and histomorphometric analysis

Mesio-distal sections were used for the histological and histomorphometric analyses. The total perimeter percentage of the implant in contact with mineralized bone matrix (hereafter referred to as bone-implant contact, BIC) was determined to evaluate the amount of bone formation in close contact with the implants. In addition, the percentage of mineralized bone matrix formed within the area between two consecutive threads (bone area between threads, BAPT) and of mineralized bone matrix within the mirror area (bone area within the mirror area, BAMA) were determined. The mirror area was defined as a symmetric area to the trapezoid between two threads, sharing the larger base of the trapezoid. For the histomorphometric analysis, images were captured using a DC300F digital video camera (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany) attached to a DMLB (Leica) microscope, and analysis was carried out using the Leica QWin software.

Statistical analysis

The data were presented as mean value $\pm$ standard deviation. The statistical unit for the analysis was the animal (n=5 to each group) for each parameter evaluated. The data were submitted to the non-parametric Kruskal-Wallis test (level of significance = 0.05).

Results

Although the statistical unit for the analysis was the animal, the number of Ti implants evaluated in each experimental group was as follows: 7 - control, 7 - autogenous bone, 8 - Bioglass[®] 45S5, 8 - Biosilicate[®].

Histological Analysis

Because there was no evidence of autogenous particulate bone in the light microscopic analysis of ground sections of the relevant group, the histological results for the control and autogenous bone groups were described concurrently. In these groups, newly-formed lamellar bone was observed adjacently to the Ti implant threads, sometimes in direct contact with the metal surface, and was characterized by concentric lamellae in new Haversian systems and parallel lamellae (Figure 2A,B). Adjacently to the outer fibrous layer of the periosteum bundles of skeletal muscle fibers were conspicuously noticed (Figure 2A,B, arrowheads).

In the Bioglass[®] 45S5 and Biosilicate[®] groups, variable quantities of glass or glass-ceramic particles accumulated closely to the Ti implants, but few were observed in intimate contact with Ti surface (Figure 2C,D). Bioglass[®] 45S5 particles exhibited mostly diffuse borders and were entirely or partially

surrounded by an Alizarin-stained matrix and a dense collagen matrix, which was stained with Stevenel's blue (Figure 3A,B). Although Biosilicate® particles exhibited similar findings (Figure 3C), they were lined by multinucleated giant cells (Figure 3D). The presence of the particle remnants of both Bioglass® 45S5 and Biosilicate® prevented the organization of muscle fiber bundles adjacently to the periosteum (Figure 2C).

Histomorphometric Analysis

No significant differences in terms of BIC, BAMA, and BABT were detected among the experimental groups. Data are presented in Table 1.

Discussion

The present results indicated that filling of intra-bony defects with Bioglass® 45S5 or Biosilicate® does not promote bone repair adjacent to Ti implants in a dog mandible model to simulate exposure of implant threads. Indeed, no significant changes in terms of BIC, BABT, and BAMA values compared to controls (grafted with autogenous bone or left untreated) were detected. Although the presence of remnants of biomaterial particles prevented the organization of skeletal muscle fiber bundles adjacently to the periosteum of the newly-formed bone, no intimate contact of lamellar bone with biomaterial particles were observed.

Concerning the experimental model, clinical observations demonstrated that the bone defects were similar in dimensions, which resulted in the exposure of four implant threads at the time of implant placement while not significantly affecting primary stability. Light microscopy of ground sections revealed that

bone repair in areas where the bone defects were mechanically made was incomplete at 18 weeks and, therefore, there was a reduction of buccal alveolar crest height irrespective of the experimental group. Newly-formed bone in the defect area occurred apically and extending towards the alveolar crest. Botticelli et al. (2003)¹² suggest that the bone repair process surrounding the implant area is mainly characterized by continuous appositional bone neoformation starting at the lateral and apical bone walls of the defect and extending coronally; and the implant-bone contact is initially established at the apical region of the defect.

Bioglass[®] 45S5 and Biosilicate[®] particles were shown to be biocompatible when used in bone defects as bone substitutes. As both glass-based biomaterials present excessive solubility, they may hamper the precipitation of apatite crystals, the formation of apatite crystals and bone formation in the implant surface.¹³ Despite that, no clear evidences that the presence of biomaterial particles promoted bone formation were observed at 18 weeks post-implantation. Indeed, no lamellar bone in intimate contact with Bioglass[®] 45S5 and Biosilicate[®] particles were noticed. One possible explanation for the low levels of BIC, BABT, and BAMA could be associated with the experimental model used, which was characterized by a large three-wall bone defect. Although not evaluated, such defect could allow the occurrence of microdislocation of the implant during the early stages of bone repair, which might account for the lack of osseointegration thereof.¹⁴

Biosilicate[®] particle sizes appeared to be less homogeneous than the ones of Bioglass[®] 45S5. However, according to the manufacturers, Biosilicate[®] particle sizes range from 290 µm to to 350 µm, whereas those of Bioglass[®]

45S5 range from 300 μm to 355 μm . Whereas both materials exhibited signs of dissolution, with irregular, diffuse borders and the deposition of a calcified matrix, only Biosilicate[®] particles were lined by multinucleated giant cells of the foreign body type. The presence of such macrophage-derived cells may cause stress cracking and oxidative damage to the biomaterial by concentrating phagocytic and degradative properties.¹⁵

In conclusion, the present study demonstrated that the strategy to fill bone defects with glass-based bioactive materials in a mandible model that simulates implant thread exposure may not promote bone repair adjacent to Ti implants. However, the presence of Bioglass[®] 45S5 or Biosilicate[®] particle remnants at 18 weeks post-Ti implant placement may be useful to prevent the occurrence of skeletal muscle tissue in the bone defect area.

Acknowledgements

The present work was supported by The São Paulo State Research Foundation (FAPESP, Brazil). Roberto de Oliveira Jabur was recipient of a Masters Scholarship from The National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil). The authors thank Mr. Sebastião Carlos Bianco (University of São Paulo at Ribeirão Preto) for technical assistance.

References

1. Castellani R, de Ruyter JE, Renggli H, et al.: Response of rat bone marrow cells to differently roughened titanium discs. Clin Oral Implants Res. 10:369, 1999

2. Hench LL: Ceramics, glasses, and composites in medicine. Med Instrum. 7:136, 1973
3. Schepers E, De Clercq M, Ducheyne P, et al: Bioactive glass particulate materials a filler for bone lesions. J Oral Rehabil. 18:439, 1991
4. Shapoff CA, Alexander DC, Clark AE: Clinical use of a bioactive glass particulate in the treatment of human osseous defects. Compend Contin Educ Dent. 18:352, 1997
5. Schepers EJ, Ducheyne P, Barbier L, et. al.: Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. Implant Dentistry. 2:151, 1993
6. Schepers EJ, Ducheyne P: Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. J Oral Rehabil. 24:171, 1997
7. Johnson MW, Sullivan SM, Rohrer M, et. al.:Regeneration of peri-implant infrabony defects using PerioGlas: a pilot study in rabbits. Int J Oral Maxillofac Implants. 12:835, 1997
8. Oonishi H, Hench LL, Wilson J, at. al.: Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. J Biomed Mater Res. 44:31, 1999
9. Villaça JH, Novaes ABR.,Souza SL, at. al.: Bioactive glass efficacy in the periodontal healing of intrabony defects in monkeys. Braz Dent J. 16:67, 2005
10. Zanotto ED, Ravagnani C, Peitl O, et. al.: Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the tratament of oral ailments, WO2004/074199, Fundação Universidade Federal de São Carlos; Universidade de São Paulo, 20.2004, Int. C. C03C10/00
11. Moura J, Teixeira LN, Ravagnani C, et. al.: *In vitro* osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate). J Biomed Mater Res A. 182:545, 2007
12. Botticelli D, Berglundh T, Buser D, et. al.: Appositional bone formation in marginal defects at implants. Clin Oral Implants Res. 14:1, 2003

13. Daculsi G, Passuti N: Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*. 11:86, 1990
14. Jung UW, Kim CS, Choi, SH, et. al.: Healing of surgically created circumferential gap around non-submerged-type implants in dogs: a histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res*. 18:171, 2007
15. da Rocha Barros VM, Liporaci JL Jr, Rosa AL, et. al.: Bone response to three different chemical compositions of fluorcanasite glass-ceramic. *J Biomed Mater Res A*. 83:480, 2007

Captions of the Figures

FIGURE 1. Experimental design showing three bone defects with randomly selected groups.

FIGURE 2. Light microscopy of ground sections of the tissue-Ti implant interface of control (A), autogenous bone (B), Bioglass[®] 45S5 (C), and Biosilicate[®] groups at 18 weeks post-Ti implant placement. No significant changes in the quantity of newly-formed lamellar bone adjacent to the four first threads were noticed. Note that skeletal muscle fiber bundles (A and B, arrowheads) are close to the Ti implant surface or periosteum for control and autogenous bone groups, while Bioglass[®] 45S5 (C) and Biosilicate[®] (D) particle remnants are partially replaced by a calcified matrix (stained in red) and surrounded by a fibrous, dense connective tissue. Alizarin red and Stevenel's blue. Scale bar: A-D = 300 μ m.

FIGURE 3. Light microscopy of ground sections of the tissue-Ti implant interface of Bioglass[®] 45S5 (A,B), and Biosilicate[®] (C,D) groups at 18 weeks post-Ti implant placement. Both Bioglass[®] 45S5 and Biosilicate[®] particles were

partially replaced by an Alizarin red stained-calcified matrix and surrounded by a dense connective tissue (A-C), although only Biosilicate[®] particles were lined by multinucleated giant cells of the foreign body type (D). Alizarin red and Stevenel's blue. Scale bar: A,C = 200 μm ; B,D = 100 μm .

FIGURE 1. Experimental design showing three bone defects with randomly selected groups.

FIGURE 2. Light microscopy of ground sections of the tissue-Ti implant interface of control (A), autogenous bone (B), Bioglass[®] 45S5 (C), and Biosilicate[®] groups at 18 weeks post-Ti implant placement. No significant changes in the quantity of newly-formed lamellar bone adjacent to the four first threads were noticed. Note that skeletal muscle fiber bundles (A and B, arrowheads) are close to the Ti implant surface or periosteum for control and autogenous bone groups, while Bioglass[®] 45S5 (C) and Biosilicate[®] (D) particle remnants are partially replaced by a calcified matrix (stained in red) and surrounded by a fibrous, dense connective tissue. Alizarin red and Stevenel's blue. Scale bar: A-D = 300 μ m.

FIGURE 3. Light microscopy of ground sections of the tissue-Ti implant interface of Bioglass® 45S5 (A,B), and Biosilicate® (C,D) groups at 18 weeks post-Ti implant placement. Both Bioglass® 45S5 and Biosilicate® particles were partially replaced by an Alizarin red stained-calcified matrix and surrounded by a dense connective tissue (A-C), although only Biosilicate® particles were lined by multinucleated giant cells of the foreign body type (D). Alizarin red and Stevenel's blue. Scale bar: A,C = 200 μ m; B,D = 100 μ m.

Table 1. QUANTITATIVE ANALYSIS (MEAN $\pm$ SD) OF BONE-IMPLANT CONTACT (BIC), BONE AREA BETWEEN THREADS (BABT), AND BONE AREA WITHIN THE MIRROR AREA (BAMA) FOR CONTROL, AUTOGENOUS BONE, BIOGLASS[®] 45S AND BIOSILICATE[®] GROUPS AT 18 WEEKS POST-TITANIUM IMPLANT PLACEMENT

Groups	BIC	BABT	BAMA
Control	18.1 $\pm$ 23.5	34.3 $\pm$ 24	29.1 $\pm$ 21.4
Autogenous bone	16.4 $\pm$ 15.4	42.4 $\pm$ 22.4	43 $\pm$ 29.5
Bioglass [®] 45S5	13.4 $\pm$ 9	26.7 $\pm$ 12.4	30.3 $\pm$ 1.7
Biosilicate [®]	22.1 $\pm$ 21	31.5 $\pm$ 22.1	29.9 $\pm$ 22.5
Kruskal-Wallis test	NS ^a	NS ^b	NS ^c

^aNon significant ($P=0.50$)

^bNon significant ($P=0.91$)

^cNon significant ($P=0.55$)