

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

André Tonetto

**O USO DE BIOMATERIAIS ASSOCIADOS A
UM COMPLEXO REGENERADOR
OSTEOARTICULAR NA FORMAÇÃO
ÓSSEA EM FENESTRAÇÕES DE
IMPLANTES DENTÁRIOS**

Passo Fundo

2013

André Tonetto

**O USO DE BIOMATERIAIS ASSOCIADOS A
UM COMPLEXO REGENERADOR
OSTEOARTICULAR NA FORMAÇÃO
ÓSSEA EM FENESTRAÇÕES DE
IMPLANTES DENTÁRIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UPF, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia – área de concentração em Clínica Odontológica, sob orientação da Profa. Dra. Márcia Borba.

Passo Fundo

2013

Ata de aprovação da banca

FICHA CATALOGRÁFICA

Agradecimentos

À Deus,

Aos meus pais José Luiz Tonetto e Eliane Tonetto exemplos de alegria, honestidade e dedicação. Obrigado por terem me mostrado o caminho correto. Obrigado por tudo.

À minha irmã, Josiane Tonetto, por ter me motivado nestes dois anos.

À Mariana Moraes Tonetto por todo o companherismo, amizade, luta e dedicação de todos estes anos.

À minha orientadora Prof. Doutora Márcia Borba. Obrigado por toda ajuda dada, pela amizade, pelos conhecimentos transmitidos e auxílio na análise estatística deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Vinícius Rosa (“Vini”) pelo auxílio, paciência, motivação e compreensão com que me conduziu ao longo deste tempo.

Aos professores do PPGOdonto UPF Álvaro Della Bona, Mateus Flores, Eduardo Dall’Magro, Bruno Carlini, Micheline Trentin, Maria Salete Linden, Luciana dos Santos. E a todos os demais professores desta instituição.

Aos meus colegas Bethânia, Bruno, Caroline, Gustavo, Cláudio, Iury, Michele, Queli e Rafael.

À Miriam (Laboratório de Microscopia da PUC-RS) pela acolhida e ajuda nas imagens de microscopia eletrônica de varredura, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos: Dr. Emerson Bernardon (Médico Veterinário – Biotério UPF), Sérgio Porto (Médico Veterinário – Biotério UPF), Dr. Renan Idalencio (Médico Veterinário – Hospital Veterinário UPF) e Dr. João Pedro S. Feranti (Médico Veterinário – Hospital Veterinário UPF), pela paciência, compromisso e participação no desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os funcionários da FOUPF e todas as pessoas que participaram e acompanharam esta pesquisa. Muito Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	16
<i>ABSTRACT</i>	18
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3 OBJETIVOS.....	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
5 RESULTADOS.....	62
6 DISCUSSÃO.....	81
7 CONCLUSÃO.....	90
8 REFERÊNCIAS.....	91
9 Apêndice.....	103
10 Artigo submetido a revista.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de 1 g do CRO.....	54
Tabela 2 – Valores de média \pm desvio-padrão da altura de osso neoformado (mm) para os tratamentos locais	66
Tabela 3 – Média do comprimento (μm) de BIC por passo de rosca	78
Tabela 4– Porcentagem do comprimento do passo de rosca em contato em contato com osso em função da quantidade de osso neoformado	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática (A) e aspecto clínico de fenestração óssea vestibular (B).....	23
Figura 2 – Implante 3,3 x 10 mm de superfície usinada	47
Figura 3 – Incisão no fêmur direito com bisturi com lâmina 15	48
Figura 4 – Rebatimento dos tecidos	48
Figura 5 – Sonda milimetrada para demarcação das distância entre as perfurações	49
Figura 6 – Broca trefina de 4 mm de diâmetro.....	51
Figura 7 – Instalação dos implantes após criação das fenestrações	51
Figura 8 – Implantes recebendo a tampa de cobertura	52
Figura 9 – Implantes instalados com fenestrações antes do tratamento .	52
Figura 10 – Representação dos quatro grupos experimentais	53
Figura 11 – Mensuração do reparo com sonda milimetrada	55
Figura 12 – Broca trefina cortando o osso que contém o implante e a fenestração.....	56
Figura 13 – Bloco contendo implante e fenestração sendo removido com auxílio de decolador Molt.....	56
Figura 14 – Bloco removido	57
Figura 15 – Defeito após remoção dos blocos	58
Figura 16 – Defeito preenchido com hidroxiapatita	58
Figura 17 – Análises histomorfométricas.....	61
Figura 18 – Imagem de MEV da hidroxiapatita (1000X)	62
Figura 19 – Imagem de MEV da hidroxiapatita (5000X)	63
Figura 20 – Imagem de MEV da hidroxiapatita (40000X)	63
Figura 21 – Imagem de MEV da membrana (20000X).....	64

Figura 22 – Imagem de MEV da membrana (20000X)	64
Figura 23 – Imagem de MEV da membrana (40000X)	65
Figura 24 – Imagem de MEV do implante (1000X)	65
Figura 25 – Imagem de MEV do implante (5000X)	66
Figura 26– Análise histológica dos tecidos formados sem CRO (A: Coágulo; B: Mem; C: HA e; D: HA+Mem).....	68
Figura 27– Análise histológica dos tecidos formados com CRO (A: Coágulo; B: Mem; C: HA e; D: HA+Mem).....	69
Figura 28– Análise histológica com dos tecidos formados sem CRO (A: Coágulo; B: Mem; C:HA e; D: HA+Mem).....	70
Figura 29– Análise histológica com dos tecidos formados com CRO (A: Coágulo; B: Mem; C:HA e; D: HA+Mem).....	71
Figura 30– Análise histológica dos tecidos formados (A: Coágulo; B: Mem; C:HA e; D: HA+Mem).....	73
Figura 31– Análise histológica dos tecidos formados (A: Coágulo; B: Mem; C:HA e; D: HA+Mem).....	74
Figura 32– A) zona madura com canais de Havers organizados (setas azuis); B) Zona de transição (entre linhas verdes e ampla área (tracejado amarelo) sem nenhum canal de Havers;C) zona imatura sem canais de Havers	75
Figura 33 – Análise histológica dos tecidos formados nos passo de rosca com a coloração azul de Stevenel e vermelho de alizarina	77
Figura 34 – Área óssea neoformada em cada passo de rosca do implante.	78
Figura 35 – Comprimento da rosca do implante em contato com o osso	79

LISTA DE ABREVIATURAS

Anova	Análise de variância
BIC	Bone-to-Implant Contact
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CRO	Complexo regenerador osteoarticular
cm	Centímetro
Cu	Cobre
mm	Milímetro
g	Gramma
GAG	Glicosaminoglicanos
HA	Hidroxiapatita
HA+Mem	Hidroxiapatita recoberta por membrana reabsorvível
kg	Quilograma
Mem	Membrana reabsorvível
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligramma
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
MSC	Célula-tronco mesenquimal
Na	Sódio
N	Newton
Nº	Número
p	Probabilidade
PVPI	Iodopovidona
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
SLA	Jateamento/condicionamento ácido
µm	Micrometro
µm ²	Micrometro quadrado
UPF	Universidade de Passo Fundo
USP	Universidade de São Paulo
Rpm	Rotações por minuto
Zn	Zinco

O USO DE BIOMATERIAIS ASSOCIADOS A UM COMPLEXO REGENERADOR OSTEOARTICULAR NA FORMAÇÃO ÓSSEA EM FENESTRAÇÕES DE IMPLANTES DENTÁRIOS

André Tonetto¹

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes tipos de tratamentos locais associados com uso de um complexo regenerador osteoarticular (CRO) na formação de tecido ósseo em fenestrações de implantes dentários em cães. A hipótese a ser testada é que o uso de hidroxiapatita associado ao CRO aumenta a osseocondução em deiscências ósseas. Doze cães foram submetidos a instalação de quatro implantes no fêmur direito e defeitos ósseos simulando fenestrações vestibulares (4 mm de altura x 4 mm de largura) foram criados e tratados como segue: somente com coágulo (Coágulo); membrana reabsorvível (Mem); hidroxiapatita (HA) e hidroxiapatita recoberta com membrana (HA+Mem). Metade dos cães receberam diariamente um comprimido de CRO. Após 90 dias os implantes foram removidos e os tecidos formados submetidos à análise histomorfométricas. Os resultados obtidos foram submetidos a Anova e teste de Tukey com nível de significância de 5%. A administração do CRO não promoveu melhoras significativas para nenhum dos parâmetros avaliados. O grupo HA+Mem obteve maior altura de tecido ósseo formado (4,13 mm) comparado ao Coágulo (3,49 mm) e Mem (3,36 mm), mas estatisticamente semelhantemente ao grupo HA (4,13 mm). Não houve diferença estatística para a quantidade de osso formada dentro dos diferentes passos de rosca do implante para nenhum dos tratamentos estudados. Os grupos HA e HA+Mem apresentaram maiores valores de osso em contato com implante (275,3 µm e 269,4µm, respectivamente) do que o Coágulo (175 µm). A hipótese foi rejeitada uma vez que o uso do CRO não foi capaz de apresentar melhoras em nenhum dos parâmetros avaliados. Por outro lado, a HA associada ou não a Mem possui capacidade de aumentar a altura de osso formado bem como o comprimento de osso em contato com implante.

¹ Aluno do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* - Mestrado da Universidade de Passo Fundo - RS

Palavras-chave: implante dentário, deiscências, hidroxiapatita, membrana,

ABSTRACT²

The objective of this study was to evaluate different local treatment strategies in association to an osteoarticular regenerative complex (ORC) for bone regeneration in dehiscence defects. The hypothesis to be tested is that using hydroxyapatite with the ORC will increase osteoconduction in dehiscence defects. Twelve dogs received 4 dental implants in the right femur and bone defects (4 mm height x 4 mm width) were created and treated as follow: only covered by the clot (Clot); reabsorbable membrane (Mem); hidroxyapatite (HA) and hydroxyapatite covered with membrane (HA+Mem). Six dogs received one pill of the ORC daily. After 90 days, implants were retrieved and the tissues formed analyzed. Results were statistically analyzed using ANOVA and Tukey's test with 5% significance level. ORC was not able to promote a significant increase in any of the parameters evaluated. HA+Mem presented the higher height of bone formation (4.13 mm) when compared to Clot (3.49 mm) and Mem (3.36 mm), but statistically similar to HA (4.13 mm). There was no difference regarding the quantity of bone formed among the four local treatments. HA and HA+Mem presented higher bone-implant-contact values (275 μm and 269 μm , respectively) than Clot (175 μm). The hypothesis was rejected since the use of ORC was not able to enhance none of the parameters evaluated. On the other hand, HA, whether associated or not to Mem, was able to increase bone height formation and bone-implant-contact.

Keywords: dental implant, dehiscence, hydroxyapatite, membrane, osteoarticular regenerative complex

² The association of an osteoarticular regenerative complex and biomaterials to achieve bone regeneration in dehiscence defects.

1 INTRODUÇÃO

Os implantes dentários osseointegráveis estão entre as melhores opções para reabilitar indivíduos com ausência de elementos dentários. Contudo, um número considerável destes pacientes necessita de reconstruções ósseas para viabilizar o sucesso estético-funcional dos implantes (CHIAPASCO e ZANIBONI, 2009).

A estabilidade dos implantes é relacionada à fatores mecânicos (geometria do implante) e biológicos (quantidade e qualidade de osso). Além disso, a estabilidade pode ser considerada: primária, ou seja, aquela encontrada imediatamente após a instalação do implante, ou secundária, obtida pela osseointegração (BRÄNEMARK *et al.*, 1969).

A fenestração óssea se caracteriza por uma perda de inserção óssea que leva à localização apical da margem gengival em relação a plataforma do implante. Os problemas clínicos decorrentes dessa condição incluem a estética desagradável, perda homeostasia periodontal e dificuldade de manutenção de higiene bucal devido à dor, o que resulta na possível perda do implante. Procedimentos cirúrgicos adicionais como enxerto de tecido conjuntivo fibroso ou enxertos ósseos são alternativas de tratamento para esse defeito. Entretanto essas alternativas nem sempre garantem a quantidade de reposição óssea necessária e exigem a execução de novas intervenções cirúrgicas (SEGUNDO, 2000). Assim, outras opções de tratamento são constantemente desenvolvidas para recobrimento destes defeitos ósseos, como o uso membranas reabsorvíveis a hidroxiapatita (YEH e HSU, 2003).

Membranas biocompatíveis são muito empregadas na Odontologia com intuito de estimular a regeneração óssea em defeitos ósseos presentes na cavidade bucal. Com sua “trama” colágena, um agente hemostático natural, possuem a habilidade de promover agregação plaquetária, facilitando o início do processo de reparo e a maturação da ferida óssea (SCHAWARZ *et al.*, 2008). As membranas a serem utilizadas podem ser reabsorvíveis (colágeno bovino ou colágeno do miocárdio) ou não reabsorvíveis, como a membrana de politetrafluoretileno (SCHWARZ *et al.*, 2008).

A hidroxiapatita é um material biocompatível, não carcinogênico e com potencial de conduzir a formação óssea, que pode ser usado quando o aumento de volume ósseo é visado para a colocação de implantes ou no tratamento de fenestrações ósseas vestibulares (SHIGEISHI *et al.*, 2012).

O complexo regenerador osteoarticular (CRO) é composto de várias substâncias/elementos que influenciam no restabelecimento das perdas quali-quantitativas das cartilagens articulares, atuando na formação de matriz orgânica do osso. Assim, considerando os problemas clínicos decorrentes das fenestrações ósseas e a grande variedade de biomateriais e tratamentos disponíveis, é importante avaliar se o uso sistêmico de um CRO possui efeito positivo no desses defeitos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Relação entre o sucesso dos implantes, qualidade e quantidade de remanescente ósseo

Quando um dente está ausente, várias opções de tratamento podem ser oferecidas aos pacientes no intuito de restaurar a função e a estética perdidas com a ausência do elemento dentário. Dependendo da razão da perda dentária, a qualidade e quantidade de osso remanescente podem ficar comprometidas. A extração dentária está diretamente ligada à deformidades da crista óssea alveolar, o que pode determinar problemas estéticos e funcionais, especialmente na reabilitação com próteses convencionais ou implanto-suportadas (BRANDÃO *et al.*, 2002).

O osso alveolar perdido ou danificado, em resposta à doença ou trauma, pode causar problemas terapêuticos no tratamento reabilitador. No entanto, outras etiologias podem também estar associadas, como avançada perda óssea em função da doença periodontal, fratura radicular extensiva, lesão cáriosa, lesões periapicais, formação de abscessos, injúria traumática e perda de estabilidade do coágulo sanguíneo (BRANDÃO *et al.*, 2002).

A doença periodontal traz danos muitas vezes irreversíveis aos tecidos periodontais e, principalmente, ao osso. A reabsorção óssea alveolar leva à perda de suporte que compromete a inserção do implante e isso pode acarretar em problemas pré, trans ou pós-operatórios (BRANDÃO *et al.*, 2002).

O tratamento com implantes dentários se tornou popular desde o início de 1980 e o sucesso depende da qualidade e quantidade de osseointegração obtida (CHAI, 2009). Conceitualmente, osseointegração é o termo que descreve a quantidade de novo osso formado que circunda e tem contato direto como implante (BRÄNEMARK *et al.*, 1969). A osseointegração em implantes dentários ocorre quando os osteoblastos migram para a micro-fenda entre o osso e a superfície do implante, conectando-se diretamente à essa superfície (ERSANLI *et al.*, 2004).

O titânio é o metal ideal para implantes dentários pois permite a formação de uma camada de óxido em sua superfície que impede a liberação de moléculas potencialmente tóxicas. O tratamento da superfície de implantes de titânio pode ser realizado para acelerar sua osseointegração, aumentando a força de adesão osso-implante e conduzindo a formação de uma estrutura óssea (ALLEGRINI *et al.*, 2006; SCHWARZ *et al.*, 2007b).

A evolução da Implantodontia na última década trouxe consigo a necessidade da utilização de técnicas de aumento dos rebordos ósseos maxilares receptores dos implantes dentários, através de enxertos ósseos e procedimentos para suas expansões (PARK, 2000).

A disponibilidade óssea é um fator importantíssimo na determinação da função e estética dos implantes, especialmente em áreas anteriores onde o resultado estético das próteses determina o sucesso do tratamento. Problemas anatômicos provocados pela ausência de tecido ósseo de suporte podem fornecer condições não ideais para a reconstrução da arcada dentária e colocação dos implantes osseointegrados em ângulos favoráveis (CHIAPASCO e ZANIBONI, 2009).

Em Implantodontia, a espessura e o volume da tábua óssea vestibular são elementos fundamentais para a estética dos tecidos moles gengivais, uma vez que deles depende diretamente a manutenção do perfil gengival. A reabsorção do osso alveolar inicia após as extrações dentárias, e é acelerada por problemas como infecção, trauma ou próteses mal adaptadas. Isso resulta na diminuição da espessura e volume ósseo alveolar, dificultando a instalação dos implantes e o sucesso a longo prazo (SEGUNDO, 2000; YEH e HSU, 2003; DI PILLO e RAPORT, 2009; MACHADO *et al.*, 2010; ERSANLI *et al.*, 2004).

A presença de fenestração na porção vestibular do osso alveolar; que suporta os tecidos moles e a altura da crista óssea interproximal, influencia no nível de papila gengival e na exposição das roscas do implante (Figura 1A), comprometendo a estética e a funcionalidade do tratamento podendo acarretar na perda do mesmo (Figura 1 B) (STANLEY e AMARAL, 2009; CHIAPASCO e ZANIBONI, 2009; SCHWARZ *et al.*, 2008).

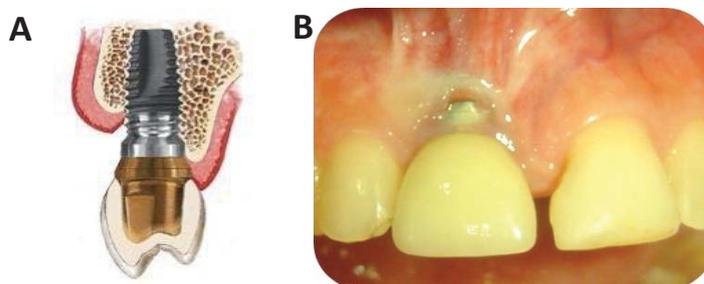


Figura 1 – Representação esquemática (A) e aspecto clínico de fenestração óssea vestibular (B)³

³ Figura 1A adaptada de <http://www.212smiling.com/img/implant1.jpg>

A criação de fenestração, também chamada de deiscência óssea, no ato cirúrgico sem a reparação conveniente constitui em um dos fatores contribuintes mais graves para o fracasso dos implantes (AKAGAWA *et al.*, 2009). As deficiências ósseas verticais são mais difíceis de serem reparadas em comparação com as horizontais (ERSANLI *et al.*, 2004).

Uma das soluções viáveis e previsíveis para problemas de reabsorções ou falta de tecido ósseo é a utilização de osso autógeno. Para aumentar o volume de rebordo alveolar existe consenso quanto à utilização de osso autógeno intra-oral em pequenos defeitos ou osso extra-oral, de crista ilíaca, quando necessário um maior volume entretanto isto exige a execução de uma cirurgia maior adicional (TROMBELLI *et al.*, 2010). Já os enxertos xenógenos, em que o tecido é oriundo de outra espécie, carregam o risco de transmissão de doenças, príons ou de gerar resposta imune do organismo receptor, podendo resultar na completa reabsorção dos fragmentos utilizados (YOSHIKAWA *et al.*, 2008).

Assim, surgem outras opções para o tratamento desses defeitos ósseos, como o uso da biomateriais hidroxiapatita e membranas biológicas, que serão relatados com mais detalhes posteriormente. Ainda, é importante ressaltar que para compreender como essas alternativas funcionam deve-se, primeiramente, ter um pleno entendimento da composição, estrutura e fisiologia do tecido ósseo.

2.2 Tecido ósseo

2.2.1 Composição

O osso é formado por cerca de 65% de compostos minerais (principalmente hidroxiapatita), 25% de matriz orgânica e 10% de água.

O colágeno representa cerca de 90% (peso seco) de fase orgânica, os 10% restantes consistem de proteoglicanos de pequeno peso molecular e proteína não-colágenas (FERRARIS e MUÑOZ, 2006).

Apesar do osso ser basicamente constituído por minerais como o cálcio e o fósforo, possui também por outros elementos como o magnésio, o flúor e o zinco. O cálcio e o fósforo estabelecem uma ligação de modo a compor cristais de forma hexagonal (hidroxiapatita) que, ao serem depositados na substância orgânica do osso, lhe atribuem uma rigidez característica (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O tecido ósseo possui células que funcionam coordenadamente mantendo-o e remodelando-o. É possível distinguir três tipos de células especializadas: osteoblastos, osteócitos e os osteoclastos. Os osteoblastos são células volumosas, com um núcleo de grandes dimensões, apresentando na sua constituição finos prolongamentos. A sua missão consiste em produzir a substância osteóide, ou seja, a matriz ou a substância na qual os minerais são depositados. Os osteócitos são células menores que correspondem a osteoblastos maduros e envelhecidos, que tiveram suas atividades diminuídas ou cessadas. Embora estas células se encontrem "presas" no interior da substância osteóide por elas próprias produzidas, podem ser ativadas se houver necessidade, reassumindo o papel de osteoblastos. Os osteoclastos são células volumosas constituídas por inúmeros núcleos, cujo citoplasma é muito rico em organelas celulares. A missão dos osteoclastos é destruir e reabsorver o osso que perdeu vigor no decorrer do tempo, tendo participação ativa no contínuo processo de óssea (FERRARIS e MUÑOZ, 2006; ANDRADES *et al.*, 2010; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A substância osteóide produzida pelos odontoblastos é formada por colágeno e por material amorfo, o qual é basicamente composto por mucopolissacáridos. Estes elementos constituem uma espécie de pequenas lâminas que ao assumirem uma determinada posição permitem a formação das unidades funcionais do osso, denominadas sistemas de Havers (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Essa matriz é mineralizada sob a influência de proteínas formando cristais em forma de placa. A maioria dessas placas de cristais de hidroxiapatita estão localizadas em uma estreita relação com as fibras de colágeno (FERRARIS e MUÑOZ, 2006).

2.2.2 Estrutura

O osso tem uma estrutura muito complexa, devido à atividade característica das células que o formam e à evidente necessidade de todos os setores disporem de uma suficiente irrigação sanguínea que lhes permita assimilar de forma eficaz elementos nutritivos. De fato, a substância osteóide elaborada pelos osteoblastos é disposta de modo a formar uma série de pequenas lâminas concêntricas à volta de um canal central, que é atravessado por um vaso sanguíneo. O conjunto formado por estas camadas concêntricas de osso denomina-se sistema de Havers (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Por sua vez, os sistemas de Havers, que percorrem longitudinalmente os ossos, comunicam entre si por intermédio de canais que lhes são perpendiculares e também possuem um vaso sanguíneo no seu interior - os canais de Volkmann (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Assim, forma-se uma rede canalicular que garante a perfusão adequada e o aporte de nutrientes necessários ao correto metabolismo ósseo. Ainda, ossos são constituídos por dois setores com características diferentes: uma parte mais compacta

denominada osso cortical e uma parte esponjosa, o osso trabecular (KIMELMAN *et al.*, 2007).

O osso cortical é formado por lâminas ósseas paralelas e extremamente próximas entre si, constituindo uma substância dura e compacta que confere resistência ao osso. Em termos gerais, este osso é responsável pela formação de uma camada exterior de espessura variável, por sua vez revestida por uma membrana resistente denominada periósteo. O osso trabecular é muito menos espesso, já que é formado por lâminas ósseas irregularmente dispostas nos vários sentidos, deixando espaços livres entre si, ocupados pela medula óssea encarregado de elaborar as células sanguíneas. Observado ao microscópio, este osso tem um aspecto poroso, semelhante ao de uma esponja (KIMELMAN *et al.*, 2007).

O osso alveolar, também denominado de processo alveolar, faz parte dos ossos gnáticos e correspondem às porções que contém os alvéolos dentários, cavidades cônicas nas quais se alojam as raízes dos dentes (FERRARIS e MUÑOZ, 2006).

O osso alveolar é formado por tábuas alveolares, sendo uma vestibular e outra lingual ou palatina. Na maxila, a tábua vestibular é mais delgada do que a palatina na região de incisivos e caninos e na mandíbula, a tábua vestibular é mais delgada do que a lingual na região de pré-molares e incisivos e mais espessa na região de molares (TEN CATE, 2001). Nas extremidades dos ossos alveolares há uma faixa de tecido ósseo compacto (cortical), podendo ser observada em radiografias como uma faixa mais radiopaca. Já no centro pode haver tecido ósseo trabecular ou esponjoso. O osso esponjoso é formado por trabéculas e espaços medulares, entre os quais há presença de medula óssea (TEN

CATE, 2001). Pode-se dizer que os processos alveolares são estruturas odonto-dependentes que se desenvolvem juntamente com os dentes, na presença destes se sustentam e quando há ausência de dentes o processo alveolar atrofia dando origem às reabsorções ósseas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

2.3 Tratamento das fenestrações ósseas

A presença de defeitos ósseos, independente de sua natureza, limita as opções de posicionamento dos implantes, fazendo com que, freqüentemente, o cirurgião-dentista se depare com situações nas quais as fenestrações parciais ou totais da parede vestibular resultem em exposições de roscas do implante (TRITTEN *et al.*, 1995). A não cobertura total das roscas do implante por tecido ósseo pode acarretar na reabsorção da crista óssea alveolar e conseqüente migração apical da margem gengival, causando problemas estéticos, dolorosos e infecciosos ao paciente (YEH e HSU, 2003).

A fenestração pode ocorrer durante ou após instalação do implante ou surgir com o uso de expansores ósseos. é mais comum na tábua óssea vestibular, porém pode ocorrer na lingual também. Em casos de fenestração extensa, impossibilitando travamento, é mais indicado primeiramente o procedimento de enxerto e uma segunda cirurgia para instalação do implante (BARBOSA *et al.*, 2009). Entretanto, quando a estabilidade primária é obtida, entre as opções de tratamento utilizadas para o reparo desses defeitos ósseos estão a hidroxiapatita e membrana reabsorvível.

2.4 Osteoindução e osteocondução

A osteoindução é o ato ou processo de estimular a osteogênese. A osteoindução é ativa e representa a habilidade do enxerto em estimular

a produção óssea, atraindo células mesenquimais, que mais tarde se tornarão osteoblastos (ALEXANDER *et al.*, 1987).

Já a osteocondução ocorre quando uma matriz física serve de arcabouço para formação de um novo osso. A osteocondução é passiva, sendo representada pela habilidade do enxerto em permitir a invasão vascular e celular proveniente da área receptora. Isto irá depender basicamente do número e tamanho dos canais através do enxerto, trazendo então os componentes necessários à formação óssea (WEIGEL, 1996).

A osteocondução é o processo tridimensional de intracrescimento de capilares em processo de brotamento, do tecido perivascular, das células osteoprogenitoras do leito recipiente em direção a estrutura de um implante ou enxerto (OPPENHEIMER *et al.*, 2008). Exemplos de materiais osteocondutores são a hidroxiapatita, o óxido de alumínio e o óxido de titânio (MARZOLA, 2005).

2.5 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita é o principal componente dos ossos e dentes, e tem sido amplamente utilizada como um importante substituto ósseo. Esta substância se distingue das demais cerâmicas à base de fosfato de cálcio por ser similar à porção inorgânica do tecido ósseo, ser biocompatível, ter boa resistência mecânica, ser bioativa, atóxica, radiopaca e permitir o acompanhamento periódico através de exames de imagem (MACHADO *et al.*, 2010; DENNY e BUTTERWORTH, 2006).

As hidroxiapatitas são usadas extensivamente na regeneração de defeitos ósseos, por serem muito semelhante à fase cristalina do osso. Desde a década de 1980, blocos e grânulos da cerâmica à base de

hidroxiapatita de cálcio porosa são usados em cirurgias ortopédicas, dentais e craniofaciais. Entretanto, existem poucos relatos que indicam que os poros dessas cerâmicas são totalmente preenchidos por tecido ósseo neoformado, provavelmente devido às poucas conexões entre os poros desta estrutura. Portanto, o desenvolvimento de cerâmicas à base de hidroxiapatita de cálcio porosa com conexões interporos de diâmetro adequado é importante para que a hidroxiapatita seja considerada o substituto ideal de osso (YOSHIKAWA *et al.*, 2008).

Há uma grande semelhança entre a hidroxiapatita natural e a sintetizada em laboratório no que diz respeito à sua composição química e comportamento *in vivo*. A hidroxiapatita apresenta reabsorção e remodelação óssea muito lenta, fazendo com que se mantenha no organismo durante anos. Apresenta uma estrutura favorável à invasão vascular, mas a lentidão de reabsorção e integração assim como a dificuldade em manter os grânulos no local do defeito ósseo, levou à necessidade de criar compósitos e pastas com características de biofuncionalidade superiores às dos seus constituintes individualmente (ARTZI *et al.*, 2003a).

A osteogênese induzida por osteoblastos é caracterizada por uma sequência de eventos que envolvem adesão celular e proliferação celular, seguidas da expressão do fenótipo do osteoblasto. No entanto, a adesão e proliferação celular na hidroxiapatita pode ser modificada devido às características topográficas da sua superfície. Essas características são determinadas pelas microporosidades da hidroxiapatita.

A topografia da superfície exerce grande influência sobre a atividade de fosfatase alcalina, adesão celular, morfologia e proliferação

de células ósseas. Utilizando discos de hidroxiapatita com diferentes porcentagens de microporosidades, sobre os quais foram cultivadas células osteoblásticas derivadas do osteosarcoma de ratos foi observado que a proliferação celular e a atividade de fosfatase alcalina foram maiores em superfícies regulares do que em superfícies irregulares. De modo que superfícies mais regulares favorecem a diferenciação de osteoblastos e, conseqüentemente, tornam o material mais biocompatível. Quanto à morfologia celular, as células cultivadas sobre superfícies mais regulares se apresentaram com ondulações e maior número de filamentos; já as células cultivadas sobre superfícies irregulares não apresentaram curvaturas nem filamentos (ROSA *et al.*, 2002).

Diversas formas de hidroxiapatita estão disponíveis para aplicações clínicas. A hidroxiapatita sintética é a mais freqüentemente utilizada, mas não reproduz, totalmente, a composição química do osso. A hidroxiapatita bovina é uma alternativa interessante para os procedimentos de regeneração óssea devido ao menor custo de produção e a sua composição semelhante ao osso (DELIGIANNI *et al.*, 2001).

Várias formas sintéticas dessa substância estão disponíveis com grande utilidade na regeneração de defeitos ósseos. Ela atua como um arcabouço (suporte passivo) oferecendo condições para que ocorra neoformação vascular, proliferação celular, crescimento fibrovascular e formação de osteóide culminando no crescimento do osso mineralizado (DENNY e BUTTERWORTH, 2006). O processo de neoformação acontece quando os osteoclastos iniciam a reabsorção de uma partícula de hidroxiapatita. As partículas menores de hidroxiapatita mais próximas do osso são atraentes para os osteoblastos que por sua vez aderem-se

rapidamente e iniciam a deposição óssea enquanto os osteoclastos têm acesso a outras partículas mais profundas dando prosseguimento ao processo (CLARKE *et al.*, 2004).

As hidroxiapatitas apresentam características diferentes dependendo do processo de fabricação. O tamanho dos cristais depende da temperatura de sinterização: altas temperaturas dão origem a compostos cristalinos e grandes; já os obtidos em temperaturas baixas apresentam baixa cristalinidade e tamanho pequeno. Os métodos de precipitação por via úmida são preferidos, devido ao produto obtido apresentar características similares às do tecido ósseo e dentário (RIGO *et al.*, 2007).

O diâmetro dos poros é um fator importante a ser observado em relação ao potencial osteocondutor da hidroxiapatita. Os poros da cerâmica à base de hidroxiapatita de cálcio são desenvolvidos para que sejam gradualmente preenchidos por tecido ósseo neoformado. Um estudo feito por Shigeishi *et al.* (2012) mostrou que os poros maiores são mais interessantes pois poros pequenos (de tamanho 45-80 μm) não foram totalmente preenchidos com tecido ósseo após 4 meses da implantação. Os autores ainda observam que poros maiores do que 80 μm são preferidos para migração de osteoblastos e consequente formação óssea.

Além do tamanho dos poros, outro fator muito importante a ser observado é a maneira pela qual estes poros estão conectados, ou seja, a quantidade de formação óssea no interior deles depende da rede de conexão dos poros. A interconexão dos poros induz migração, adesão e proliferação de osteoblastos no interior destes. A cerâmica à base de hidroxiapatita de cálcio possui estrutura tridimensional, na qual os poros

são de tamanho uniforme, e são interconectados por “janelas”. Essa interconexão tem potencial para compensar o crescimento limitado de tecido ósseo dentro dos poros (YOSHIKAWA *et al.*, 2008).

As cerâmicas de hidroxiapatita com poros interconectados possuem poros suficientemente largos para abrigar o crescimento ósseo em seu interior. Esse tipo de hidroxiapatita é usada para promover osteocondução *in vivo*, em cirurgias ortopédicas e na engenharia de tecido ósseo com uso de células-tronco (YOSHIKAWA *et al.*, 2008).

Uma forma da hidroxiapatita que merece atenção é a apresentada em grânulos, já que esta forma facilita a adaptação e contorno dos defeitos ósseos e é quimicamente estável. Grânulos porosos são bem tolerados pelo tecido ósseo, além de facilitar a infiltração de osteoblastos e proliferação de vasos sanguíneos essenciais ao processo regenerativo (PINHEIRO *et al.*, 2008).

2.6 Membranas biológicas

As membranas biológicas são usadas como uma barreira física (mantendo as células ósseas confinadas) o que permite uma regeneração tecidual guiada (RTG), impedindo assim que as células não osteogênicas infiltrem no local de reparo, o que influencia na qualidade da cicatrização (YEH e HSU, 2003; BUSER, 2006). A permeabilidade da membrana permite troca de nutrientes e favorece a RTG. Desse modo, fatores de crescimento (responsáveis pela neoformação óssea) ficam concentrados no local de reparo, melhorando a qualidade óssea pela eliminação de interferência das células do conjuntivo epitelial e gengival (OLIVEIRA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Membranas biocompatíveis são muito empregadas na Odontologia com intuito de estimular a regeneração óssea em defeitos

ósseos presentes na cavidade bucal. A maioria das membranas de colágeno disponíveis comercialmente é proveniente do colágeno tipo I, mas existem membranas compostas de colágeno tipo III. A origem do colágeno pode ser proveniente de diferentes espécies (bovina, suína e ratos) e sítios anatômicos (pericárdio, dura-máter, fáscia do temporal, derme, tendão entre outros). As membranas de trama colágena são consideradas agentes hemostáticos naturais que possuem a habilidade de promover agregação plaquetária, facilitando o início do processo de reparo e a maturação da ferida. Apresentam também baixa imunogenicidade, capacidade para aumentar a espessura dos tecidos, fácil manipulação, além de não levarem à formação de quelóide nos procedimentos regenerativos (SCHWARZ *et al.*, 2008).

As membranas podem ser absorvíveis ou não, e fatores como sua constituição, morfologia, textura da superfície, tamanho das porosidades e duração da integridade funcional podem influenciar no êxito da sua utilização para a regeneração óssea. As absorvíveis podem ser de colágeno, cortical bovina liofilizada ou celulose oxidada, e são amplamente usadas na Odontologia devido ao baixo custo e qualidade clínica comprovada. As membranas não-absorvíveis são feitas de politetrafluoretileno expandido são ainda bastante usadas em virtude das suas excelentes propriedades mecânicas, biocompatibilidade e facilidade de manejo (ARTZI *et al.*, 2003b) entretanto exigem uma fase cirúrgica adicional para sua remoção (MOSES *et al.*, 2005).

Na Odontologia, a principal utilização da técnica de RTG compreende as lesões periodontais, entre elas, as de comprometimento de furca, as infraósseas e os procedimentos cirúrgicos combinados à cirurgia parodontal. A técnica de RTG, é indicada, principalmente,

para fechamento de defeito ósseo alveolar, alargamento ou aumento de rebordo alveolar, deiscência ósseas alveolares, associadas a implantes bucais, instalação de implantes imediatos após extração entre outros. Os procedimentos com membranas absorvíveis têm a vantagem de eliminar uma segunda etapa cirúrgica necessária para sua remoção evitando assim traumas nos novos tecidos formados (MOSES *et al.*, 2005). Por outro lado, uma grande desvantagem das membranas é a biodegradação rápida, o que pode gerar interferência de tecidos vizinhos no defeito ósseo (ROTHAMEL *et al.*, 2005; SELA *et al.*, 2003).

Assim, para evitar a formação de deiscências, o isolamento da ferida com membranas pode ser aplicado para impedir a invaginação do epitélio para dentro do alvéolo e favorecer a proliferação de células necessárias para a cicatrização. Desse modo, a membrana faz um confinamento do coágulo dentro do alvéolo, ocorrendo assim uma angiogênese e conseqüentemente, através de células osteoprogenitoras, haverá uma formação óssea (SCHWARZ *et al.*, 2007a; FRIEDMANN *et al.*, 2002; SCHWARZ *et al.*, 2008). Esse coágulo formado, será a fonte de células osteogênicas que darão origem à vasos sanguíneos. E a partir daí a angiogênese desempenha um papel importante na regeneração óssea, incluindo a osseointegração (SCHWARZ *et al.*, 2008).

A ação estabilizadora da membrana permite que a ação mecânica que atua no retalho seja aplicada na própria membrana livrando o coágulo dos movimentos que durante os estágios iniciais de cicatrização da ferida são suficientes para desviar a diferenciação de células mesenquimais em fibroblastos ao invés de osteoblastos (SCHWARZ *et al.*, 2006).

2.7 O uso de membranas reabsorvíveis e hidroxiapatita para regeneração óssea

Existem diversos estudos a respeito dos diferentes tratamentos para o reparo de defeitos ósseo, envolvendo modelos animais e seres humanos. Estes mostram resultados positivos para as variadas opções de tratamento das fenestrações porém sem consenso sobre a opção mais eficiente.

Cho *et al.* (1998) avaliaram a formação óssea alveolar em deiscência de implantes dentários em mandíbula de cães. Foram utilizados 32 implantes, sendo metade com tratamento de superfície do tipo jateamento de plasma e a outra metade revestidos com hidroxiapatita. Os implantes foram instalados após as extrações de pré-molares. Previamente à inserção dos implantes foram criadas fenestrações de 3 mm de largura e 5 mm de altura na porção vestibular do osso. Os implantes foram recobertos somente com coágulo, coágulo e membrana, somente membrana ou tecido gengival. Após 12 semanas, não foi observada influência do tratamento de superfície nos tecidos obtidos. A associação da RTG com membrana (enxerto aloplástico) resultou em fechamento quase completo do defeito, entretanto a taxa de formação óssea foi maior para o grupo de RTG sem enxerto ósseo. Como conclusão, o estudo destaca que a RTG somente foi capaz de promover fechamento do defeito ósseo e a adição de enxerto aloplástico não melhorou o processo de cicatrização no modelo estudado.

Brunel *et al.* (2001) submeteram 14 pacientes a procedimentos de RTG com membrana de colágeno e enxerto de hidroxiapatita em rebordos alveolares. Após 8 meses, os rebordos alveolares foram

reabertos para colocação de implantes e obtenção de tecido para biópsia. Foi observada uma grande quantidade de grânulos residuais de hidroxiapatita e osteócitos, além de ativa reabsorção óssea que denota um processo dinâmico de remodelação óssea.

Artzi *et al.* (2003a) avaliaram a taxa de osteocondução de um material ósseo bovino inorgânico em defeitos ósseos criados em cães, protegidos ou não por uma membrana de colágeno bioabsorvível em diferentes períodos de acompanhamento. Foram criados bilateralmente quatro defeitos intra-ósseos ovais (5 de largura x 4 mm de altura) na mandíbula dos cães. Em dois sítios foram utilizados osso bovino inorgânico e em outros dois sítios permaneceu apenas o coágulo sanguíneo. Uma membrana colágena recobriu um defeito com e sem osso bovino. Em ambos grupos, o padrão crescente de osteocondução ao longo dos diferentes períodos avaliados (até 24 meses) foi semelhante, bem como o padrão de diminuição da concavidade remanescente da configuração do defeito. Em 3 meses, nos sítios onde não havia proteção, a área de formação óssea foi de 23,1% e no sítio com proteção, foi de 26,4%. Não houve diferença entre os defeitos protegidos ou não pelas membranas exceto para a presença de centros altamente ossificados ao redor dos defeitos protegidos. No sítios com enxerto, a proteção da membrana mostrou área de neoformação óssea próxima às paredes ósseas remanescentes e particularmente sob a membrana, estabelecendo uma ponte óssea sobre o defeito nos diferentes períodos avaliados. O grupo com o coágulo sem proteção mostrou formação óssea somente na base e próximo as paredes ósseas deixando a área neoformada com aspecto côncavo. Após 2 anos, os sítios em que foram usados enxertos estavam completamente regenerados, entretanto, partículas não

reabsorvidas completamente circundadas pelos osso neoformado ainda eram encontradas.

Oliveira *et al.* (2004) trabalharam na técnica da RTG baseada na separação dos tecidos através de membranas ou barreiras. O objetivo do estudo foi avaliar a resposta tecidual à membrana obtida da cortical de ratos. A análise dos cortes histológicos mostrou que a reabsorção da membrana se iniciou 15 dias pós-implantação e ao final de 60 dias apenas resquícios foram detectados em alguns animais. Foi observado também que a presença do cálcio no biomaterial ativou o recrutamento de células gigantes multinucleadas, o que levou a explicar a maior rapidez da degeneração da membrana.

Schwarz *et al.* (2008) avaliaram o padrão imunohistoquímico da RTG, utilizando diferentes tipos de membranas como barreira e explorando o uso de hidroxiapatita em defeitos de deiscência em 12 cães da raça beagle. Os tipos de membranas estudadas foram à base de colágeno, colágeno do miocárdio, colágeno reforçado com titânio e politetrafluoretileno expandido. O coágulo foi utilizado como grupo controle. Após 1, 2, 4, 6, 9 e 12 semanas de cicatrização, lâminas foram processadas para imuno-histoquímica e análise histomorfométrica mostrando em geral, a angiogênese e formação de novo osso. Houve maior formação óssea nas membranas de politetrafluoretileno expandido. Foi observado que em 4 a 8 semanas houve uma grande formação de vasos sanguíneos e após 24 semanas não houve mais sinais de marcadores ligados angiogênese. A extensão do implante em contato com o osso neoformado (BIC – *Bone-Implant Contact*) após 12 semanas foi estimada em 62% para o coágulo, 56% com uso da hidroxiapatita e 59% com uso membrana.

Machado *et al.* (2010) avaliaram a biocompatibilidade e a osteocondução em 3 defeitos cirúrgicos (2 mm de diâmetro) na tíbia de ovelhas, preenchidos com microesferas de nano-hidroxiapatita, coágulo (controle) e microesferas de nano-hidroxiapatita com estrôncio. Após 30 dias do preenchimento dos defeitos com os materiais, os blocos ósseos foram removidos e os animais mantidos vivos. O grupo controle (coágulo) teve neoformação óssea da periferia para o centro do defeito ósseo, já os grupos contendo as hidroxiapatitas também apresentaram o mesmo padrão de neoformação óssea mas a porção central do defeito estava composta por tecido conjuntivo frouxo com presença de biomaterial. Foi observado que o estrôncio promove uma neoformação óssea em íntimo contato com o biomaterial, porém com menos intensidade de formação óssea. Além disso, a hidroxiapatita contendo estrôncio promove a adesão de células osteoprogenitoras e proliferação celular.

2.8 Complexo Regenerador Osteoarticular – CRO

O CRO é composto de várias substâncias/elemento que influenciam no restabelecimento das perdas quali-quantitativas das cartilagens articulares, possivelmente atuando também na formação de matriz orgânica do osso, consistindo assim em regenerador osteoarticular.

Essa classe de medicamentos faz parte do grupo recentemente denominado como drogas osteoartíticas modificadoras da doença, visto que seus efeitos têm por objetivo prevenir, retardar ou reverter as alterações patológicas da cartilagem (SARZI *et al.*, 2005). Geralmente, seu uso está indicado quando se suspeita de lesões na cartilagem e nem tanto nos casos de sinovite. O tratamento profilático é aventado

(CONSTANCE *et al.*, 2004). Dentre os principais componentes dos complexos regeneradores disponíveis pode-se destacar os glicosaminoglicanos, sulfato de condroitina, vitaminas e elementos químicos como zinco, magnésio e manganês.

A cartilagem é composta por glicosaminoglicanos, colágeno, ácido hialurônico, proteoglicanos, bem como outros lubrificantes (SUMMERS *et al.*, 1994). É um tecido que após o desenvolvimento, se expande em tamanho por deposição de colágeno e glicosaminoglicanos exigindo uma fonte de sulfatos orgânicos para essa síntese. Os glicosaminoglicanos são metabolizados pelo corpo liberando o sulfato livre, que é excretado através da urina. Uma deficiência de manganês pode reduzir a quantidade e qualidade da cartilagem (YAMKA *et al.*, 2006).

Um componente natural da cartilagem que reveste as articulações é o sulfato de condroitina o qual é um composto que bloqueia as enzimas que podem destruir o tecido cartilaginoso. Acredita-se também o sulfato de condroitina serve para promover retenção de água e elasticidade na cartilagem articular (NEWNHAM, 1994).

Os glicosaminoglicanos e o sulfato de condroitina A (princípio ativo do complexo regenerativo) exercem ações também na cartilagem osteoartrótica, favorecendo a atividade reparativa frente a perdas ocorridas por lesões degenerativas e estimulando o metabolismo da cartilagem (VIEIRA *et al.*, 2010).

Os condroprotetores (glicosaminoglicanos e o sulfato de condroitina A) são substâncias compostas por agentes semelhantes aos componentes da matriz cartilaginosa e tem sido muito empregados nos tratamentos de doenças articulares degenerativas na medicina

veterinária. Eles possuem ação antiinflamatória e são capazes de reduzir a perda de proteoglicanos e colágeno, pela inibição de enzimas degradativas da cartilagem, além de terem uma ação estimulatória sobre a síntese destes compostos, promovendo aumento na proliferação de condrócitos e síntese de matriz (CLARK, 1991; VAUGHAN-SCOTT e TAYLOR, 1997).

O sulfato de condroitina possui ação antiinflamatória semelhante à da glicosamina, inibindo diversas proteases e citocinas prejudiciais à cartilagem que são secretadas por leucócitos e condrócitos. Ele ainda é capaz de inibir a depressão de proteoglicanos da cartilagem articular induzida por agentes que mimetizam a degeneração natural (VAUGHAN-SCOTT e TAYLOR, 1997).

As vias oral e intramuscular são as formas de aplicação mais utilizadas. A utilização desses compostos por via oral ocorre na forma de suplementos alimentares diários. Os mais comumente encontrados são a glicosamina e o sulfato de condroitina. O mecanismo exato de funcionamento, porém, ainda deve ser esclarecido. Da mesma forma para o sulfato de condroitina, que demonstrou efeitos semelhantes à glicosamina. Parece haver um sinergismo entre os dois compostos, o que justifica o seu uso associado. A dose utilizada varia conforme a preparação comercial (CONSTANCE *et al.*, 2010).

Outras vitaminas e minerais como fósforo, zinco, magnésio, manganês, vitamina K, vitamina B6 e vitamina B12 também são muito importantes para o desenvolvimento das cartilagens e crescimento dos ossos. A vitamina B6, tal como a maioria das vitaminas do grupo B, é essencial para o funcionamento de numerosas enzimas. A sua importância está relacionada com o controle dos níveis de colesterol,

pressão sangüínea e no funcionamento cardíaco e muscular (ELLIS *et al.*, 1991).

O zinco (Zn) é material citotóxico que quando usado em grandes concentrações inibe o crescimento dos cristais de apatita, retardando o crescimento ósseo. Em baixas concentrações, os íons Zn estimulam o efeito de formação óssea, aumentando a quantidade de proteína, o conteúdo de cálcio e a atividade de fosfatase alcalina das células ósseas. Também tem efeito na reabsorção de osteoclastos (YAMAGUCHI, 2010). O zinco é um mineral essencial para reparar feridas, crescimento em crianças, sintetizar proteínas, ajudar as células a se reproduzir, aumentar imunidade e proteger contra os radicais livres. Exerce também atividades anti-inflamatória e antioxidante (NEWNHAM, 1994).

O magnésio é outro mineral importante na manutenção da massa óssea. O magnésio participa na atividade enzimática e envolve o fornecimento de energia às células. Age sobre o sistema nervoso central e o sistema nervoso simpático e também sobre o aparelho muscular; além disso, ele beneficia o equilíbrio do cálcio e intervém na contração normal dos músculos: logo, é indicado para as pessoas que sofrem de perturbações neuropsíquicas e aos deficientes cardíacos. O magnésio, além do mais, intervém diretamente na luta contra certos germes infecciosos (GARLAND, 1992).

O manganês é um elemento de propriedades dessensibilizantes e um dos mais úteis para corrigir as disfunções. A eficácia de sua ação atua nos estados alérgicos, em casos de artrose, na fadiga habitual, nas manifestações de ansiedade e na disfunção da tireóide. É também indicado em caso de arites dolorosas, e em certos distúrbios digestivos

que atingem sobretudo o estômago e o duodeno. Para reforçar sua ação terapêutica ele é, segundo o caso, associado quer ao cobre, quer ao cobalto (WALTER *et al.*, 1991).

O cobre possui uma intervenção catalítica sobre o organismo é indispensável para a fixação do ferro nos glóbulos vermelhos do sangue, de onde sua utilidade em caso de anemias e astenias: porém, suas maiores propriedades são a luta contra as inflamações e as infecções. Associado ao manganês, reforça a ação deste nos estados alérgicos e nos reumatismos inflamatórios, regularizando e estimulando a ação das cápsulas supra-renais: sua prescrição permite ao organismo formar anticorpos e antitoxinas microbianas (BAIERLE *et al.*, 2010).

Muitos dos componentes dos CRO possuem relação com os mecanismos e metabolismo ósseo. A formação óssea *per se* também é intimamente ligada com processos envolvendo cartilagens uma vez que a formação de ossos longos se dá por via endocondral. Desta forma, é possível aventar que o CRO possa favorecer de alguma forma a neoformação óssea em áreas defeituosas.

Face a diversidade de resultados obtidos com diferentes tratamentos locais e a ausência de estudos avaliando o uso de CRO para regenerar defeitos ósseos em implantes dentários, este estudo tem como objetivo avaliar diferentes tipos de tratamento para a formação de tecido ósseo em fenestrações ósseas vestibulares de implantes dentários. Será testada a hipótese de que a hidroxiapatita associada ao CRO aumenta a condução da formação de osso em casos de fenestrações ósseas vestibulares, comparado aos demais tratamentos.

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo investigar o uso de membrana colágena reabsorvível e hidroxiapatita associadas a um CRO na regeneração óssea de deiscências em implantes dentários. A hipótese a ser testada é que a associação de hidroxiapatita e CRO promove um aumento significativo da altura e quantidade de osso formado bem como o comprimento de contato entre implante e osso comparados aos outros tratamentos investigados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo em março de 2012 (Parecer CEUA-UPF N° 002/2012) (Anexo 1).

4.1 Caracterização dos materiais para regeneração

Os biomateriais utilizados (membrana e hidroxiapatita) e os implantes foram previamente caracterizados utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV, JEOL-JMS-T33 A Scanning Microscope, JEOL Inc., Peabody, USA).

4.2 Seleção e adequação dos animais

Doze cães foram selecionados e submetidos a procedimentos cirúrgicos para instalação de implantes osseointegráveis no fêmur direito. Foram selecionadas fêmeas de raça indefinida com idade entre 3 a 5 anos e massa corporal variando de 10 a 25 kg. Os critérios de exclusão foram: cães gestantes, problemas físicos e exames laboratoriais de sangue fora dos padrões normais aceitáveis para realização de cirurgias.

Os cães, foram identificados com uma tatuagem com numeração na orelha e mantidos no Biotério da Universidade de Passo Fundo durante o período do estudo (90 dias). Os animais receberam medicação antiparasitária, antifúngica e antibiótica e foram submetidos a um período de adaptação de 15 dias no Biotério sob supervisão de um médico veterinário credenciado pelo da Universidade de Passo Fundo.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo.

Antes do início dos procedimentos cirúrgicos os animais foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas e hídrico de 4 horas e exames laboratoriais sanguíneos. A medicação sedativa pré-anestésica aplicada foi acepromazina 0,05 mg/kg e morfina 0,4 mg/kg, ambos de forma intra-muscular, 15 minutos antes da indução anestésica. A indução foi realizada com propofol 4 mg/kg diluído em soro através de acesso venoso. A manutenção sedativa foi realizada por via traqueal com o uso de isoflurano em vaporizador universal com 100% de oxigênio. O controle da dor transoperatória foi realizado utilizando lidocaina 2% (4 mg/kg) associado a morfina 0,1 mg/kg.

No transoperatório foi usado o antibiótico cefalotina 25 mg/kg e antiinflamatório meloxicam 0,2% (0,2 mg/kg). O controle pós-operatório foi realizado por 3 dias com uso de meloxicam 0,2% (0,1 mg/kg), tramadol 3 mg/kg e cefalotina 25 mg/kg.

4.3 Inserção dos implantes e confecção dos defeitos ósseos (fenestrações)

Os cães foram submetidos à instalação de quatro de implantes de titânio comercialmente puro no fêmur direito. Os implantes são de titânio grau IV, hexágono externo (Figura 2), sem tratamento de superfície (usinada), com dimensões de 3,3 mm de diâmetro e 10 mm de altura (DSP Biomedical[®], Campo Largo, Paraná, Brasil).



Figura 2 – Implante 3,3 diâmetro x 10 mm de altura de superfície usinada

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com os princípios de biossegurança. Os materiais e instrumentais utilizados para na realização das cirurgias foram esterilizados em autoclave. Foi realizada a tricotomia nas regiões de acesso cirúrgico. Essas regiões e todos os equipamentos receberam anti-sepsia com iodopovidona (PVPI) 10%.

O acesso cirúrgico foi realizado com lâmina de bisturi nº 15 na região externa do fêmur direito dos animais (Figura 3). Após o rebatimento dos tecidos realizado por médico veterinário (Figura 4), foram realizadas perfurações com fresa em forma de lança com ponta triangular e de perfil 2,0 mm para marcação inicial do local de instalação dos implantes (Figura 5), respeitando uma distância de 5 mm entre as perfurações.



Figura 3 – Incisão no fêmur direito com bisturi com lâmina 15



Figura 4 – Rebatimento dos tecidos

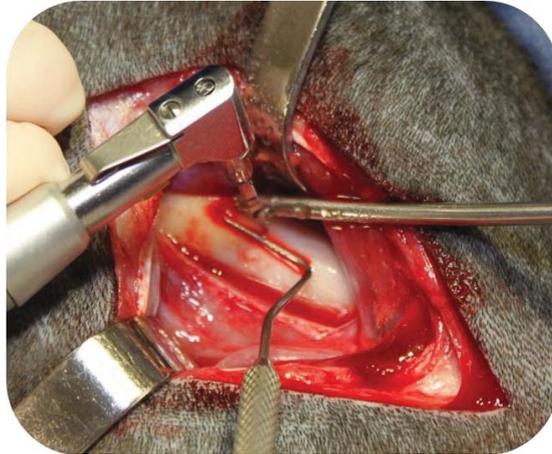


Figura 5 – Fresa em forma de lança para marcação inicial da perfuração

Para realizar as perfurações, utilizou-se um motor elétrico (Modelo Driller Smart[®], São Paulo-SP, Brasil) com mostrador digital de torque e velocidade controlados, além de um contra-ângulo redutor (Koncept 20:1, Kavo, São Paulo, Brasil).

Em função da morfologia do fêmur dos cães, foi necessário fazer algumas modificações na técnica de inserção dos implantes visando garantir uma estabilidade primária destes a partir da porção óssea cortical. Isto porque, a cortical externa do fêmur destes animais tem cerca de 2 mm de espessura, seguida de uma porção medular com trabeculado ósseo praticamente inexistente, de consistência extremamente macia.

Assim todos os sítios ósseos foram preparados obedecendo a seguinte seqüência, conforme indicações do fabricante do sistema de implante (DSP Biomedical[®], Campo Largo, Paraná, Brasil):

1. fresa em forma de lança com ponta triangular e de perfil 2,0 mm para marcação inicial da perfuração;
2. fresa helicoidal de 2,0 mm de diâmetro para penetração intra-óssea, apenas para romper a cortical óssea superior;
3. fresa helicoidal de 2,5 mm de diâmetro para alargamento da perfuração.

Toda seqüência de fresagem foi realizada na velocidade de 1200 rpm (rotações por minuto) e torque de 35N/cm, usando um contra-ângulo redutor de 20:1 através do osso cortical, com uma constante e intensa irrigação externa de soro fisiológico a 0,9 % para evitar o superaquecimento ósseo.

Após, foram confeccionados os defeitos ósseos (fenestração) com broca trefina de 4 mm de diâmetro (Figura 6) e irrigação abundante com soro fisiológico.

Esses defeitos produzidos possuíam 4 mm de largura e 4 mm de altura medidos com uma sonda milimetrada. Para auxiliar na remoção da cortical óssea após o corte feito pela trefina, foi utilizado um descolador de molt número 4.

Os implantes foram inseridos com o contra-ângulo em velocidade reduzida de 30 rpm através de conectores compatíveis com o diâmetro, sem contato manual direto com o animal (Figura 7). Estes foram inseridos até o limite da cortical óssea superior. Todos os implantes receberam um parafuso de cobertura (Figura 8) e seus respectivos tratamento de acordo com seu grupo experimental. Clinicamente todos implantes obtiveram boa estabilidade primária.



Figura 6 – Broca trefina de 4 mm de diâmetro

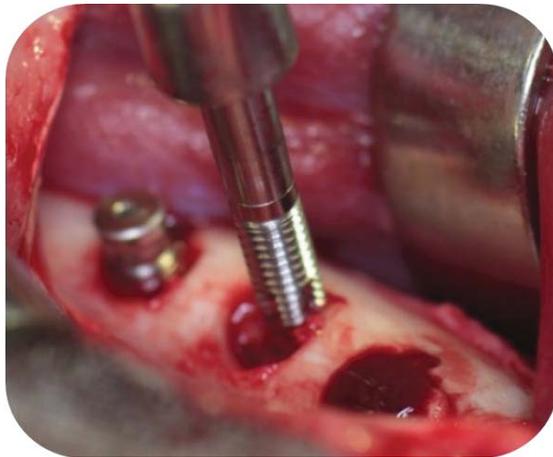


Figura 7 – Instalação dos implantes após criação das fenestrações



Figura 8 – Implantes recebendo a tampa de cobertura

A Figura 9 mostra os implantes insatalados e as fenestrações criadas.

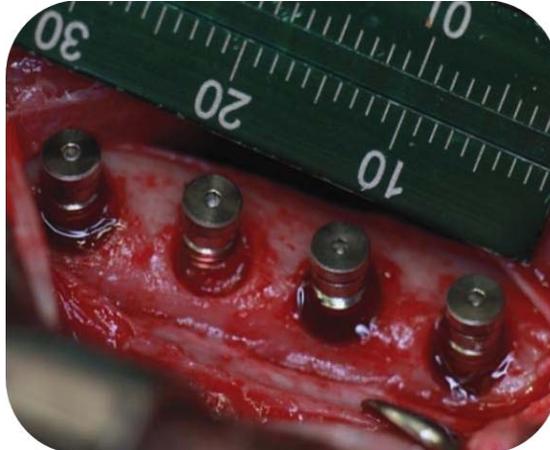


Figura 9 – Implantes instalados com fenestrações antes do tratamento

4.4 Tratamento das fenestrações

Todos os cães receberam quatro implantes e foram submetidos aos quatro tratamentos locais de acordo com o esquema da Figura 10.

Coágulo: o defeito ósseo e o implante foram recobertos com o coágulo e o tecido mole reposicionado (controle);

Mem: o defeito ósseo e o implante foram recobertos pela membrana reabsorvível de colágeno bovina (GenDerm®, Baumer S.A., Mogi Mirim, SP);

HA: o defeito ósseo e o implante foram recobertos com hidroxiapatita (OsteoGen®, Intra-Lock, Implants LTD, EUA);

HA+Mem: o defeito ósseo e o implante foram recobertos com hidroxiapatita e membrana reabsorvível de colágeno bovina.

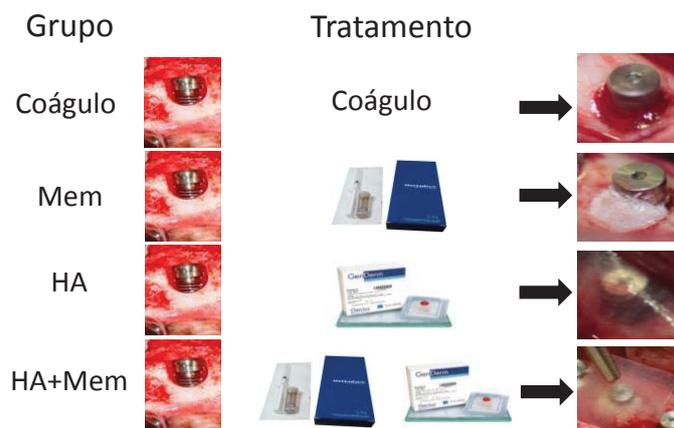


Figura 10 – Representação dos quatro grupos experimentais

Todas membranas foram cortadas e adaptadas sobre o defeito, de modo a cobrir 2 a 3 mm de osso circundante aos implantes. Nem suturas, nem pinos foram usados para fixação ou estabilização da membrana. Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo operador.

A hidroxiapatita foi retirada da embalagem comercial e acondicionada em um pote de vidro estéril onde foi acrescido 4 a 5 gotas de soro fisiológico para se obter uma consistência arenosa trabalhável. Sequencialmente, a pasta de hidroxiapatita foi levada com um descolador de Molt para cobrir as roscas do implante expostas.

Após o tratamento de cada grupo, as feridas cirúrgicas foram recobertas com o tecido rebatido. Suturas foram realizadas dos tecidos mais profundos até o tecido mais superficial objetivando recobrir totalmente o implante com fechamento do retalho cirúrgico. A sutura foi realizada com o fio de *nylon* (Vicril 3-0, Ethicon, Brasil).

Após a “alta” do Hospital Veterinário (aproximadamente 4 dias após as cirurgias), os animais foram deslocados ao Biotério da UPF, onde receberam analgésicos, anti-inflamatórios e antibióticos e acompanhamento diário pelo médico veterinário e funcionários do Biotério da Universidade de Passo Fundo e semanal pelos responsáveis pela pesquisa.

Seis cães foram sorteados e receberam diariamente (no período da manhã) um comprimido de um CRO manipulado (dose única) de acordo com a

Tabela 1, por um período de 90 dias.

Tabela 1 – Composição de 1 g do CRO

Glucosamina	220,87 mg	Gluconato de Zn	16,910 mg
Metionina	52,20 mg	Gluconato de Mg	10,460 mg
Cistina	8,35 mg	Gluconato de Mn	10,460 mg
Betaina	4,180 mg	Glicinato de Cu	1,460 mg
Histidina	4,180 mg	Selenito de Na	0,005 mg
Vitamina B ₆	8,350 mg	Excipiente, q.s.p.	1,000 mg

Vitamina E 6,261 mg

4.5 Remoção cirúrgica dos blocos ósseos e implantes

Após 90 dias os cães foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos (tricotomia, sedação e intubação) para a remoção dos blocos ósseos envolvendo os implantes e a região do defeito.

Antes da remoção do implante, a profundidade do defeito (distância da plataforma do implante até o tecido neoformado) foi medida com sonda milimetrada (Figura 11).

A remoção do bloco ósseo e implante foi realizada com broca trefina de 6 mm de diâmetro (Figura 12), para obter uma margem de aproximadamente 2 mm à frente do defeito (Figura 13).

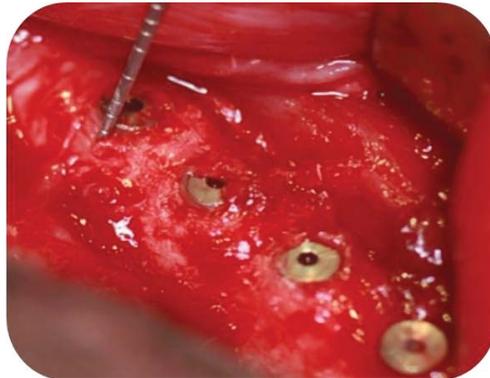


Figura 11 – Mensuração do reparo com sonda milimetrada



Figura 12 – Broca trefina cortando o osso que contém o implante e a fenestração



Figura 13 – Bloco contendo implante e fenestração sendo removido com auxílio de decolador Molt

Depois de realizada a remoção dos blocos (Figura 14), o tecido mole foi reposicionado (Figura 15), e os orifícios foram preenchidos

com hidroxiapatita (Figura 16). Placas de titânio foram fixadas para reforçar a estrutura óssea remanescente quando necessário.

Nenhum cão foi a óbito para a remoção das amostras e os cuidados pós-operatórios foram os mesmos descritos anteriormente, acompanhamento diário por funcionários do biotério, e semanal pelos responsáveis da pesquisa, pelo período de duas semanas.

Os blocos removidos foram acondicionados em recipientes estéreis com formalina 10% para fixação das peças por 24 horas a temperatura ambiente. Após, a formalina 10% foi substituída por álcool 70% e então os blocos processados para obtenção dos cortes para análise histológica.



Figura 14 – Bloco removido



Figura 15 – Defeito ósseo após remoção dos blocos



Figura 16 – Defeito preenchido com hidroxiapatita

4.6 Preparo das lâminas para histomorfometria

As peças foram desidratadas, utilizando uma série crescente de álcoois até 100%. Após, as amostras ficaram 72 horas em um dessecador

a base de sílica para remover toda a umidade otimizando os procedimentos de inclusão.

Depois os blocos ósseos foram assentados no fundo de recipientes para serem incluídos em resina acrílica (Kit EMBED 812, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA), manipulada conforme recomendação do fabricante para consistência *soft*.

Os blocos, incluídos em resina, foram seqüencialmente cortados com um disco diamantado no equipamento Exakt[®] (Klzer, Norderstedt, Alemanha) no laboratório de tecidos mineralizados do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, perfazendo todo o diâmetro do implante, numa espessura média de 30 µm por corte.

Para a obtenção da espessura final, foi necessário que os cortes fossem cuidadosa e seqüencialmente lixados e polidos numa politriz metalográfica (Struers[®], DP 10, Willich, Alemanha) com papel metalográfico (granulações 1000, 1500, 2000, 2500 e 4000 *mesh*) sob refrigeração abundante com água até se obter uma espessura final de 10 a 19 µm.

A limpeza das fatias exigiu lavagem em água corrente e imersão em água destilada para limpeza ultra-sônica durante 5 minutos, seguido de secagem com papel absorvente. O armazenamento foi feito em caixas de madeira, com subdivisões para cada peça, com controle de umidade através de dessecantes. Após, os blocos foram submetidos aos processos de colorações de eosina e hematoxilina (H&E) e azul de Stevenel e vermelho de alizarina de acordo com os protocolos utilizados pelo Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.7 Análises histomorfométricas

A caracterização dos tecidos obtidos foi realizada com uso de microscopia óptica (Leica DMI4000 B, Leica Microsystems, Alemanha). A área de osso neoformado e o comprimento do osso em contato direto com o implante (*bone-to-implant contact* – BIC) em cada um dos quatro primeiros passos de rosca do implante foi determinado com uso de *software* analisador de imagens (ImageJ, NIH, Estados Unidos da América) de acordo com o esquema apresentado na Figura 17. As análises das lâminas foram realizadas por três examinadores previamente calibrados e cegos. Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística de Anova e teste de Tukey para comparação de médias, com nível de significância de 5%.

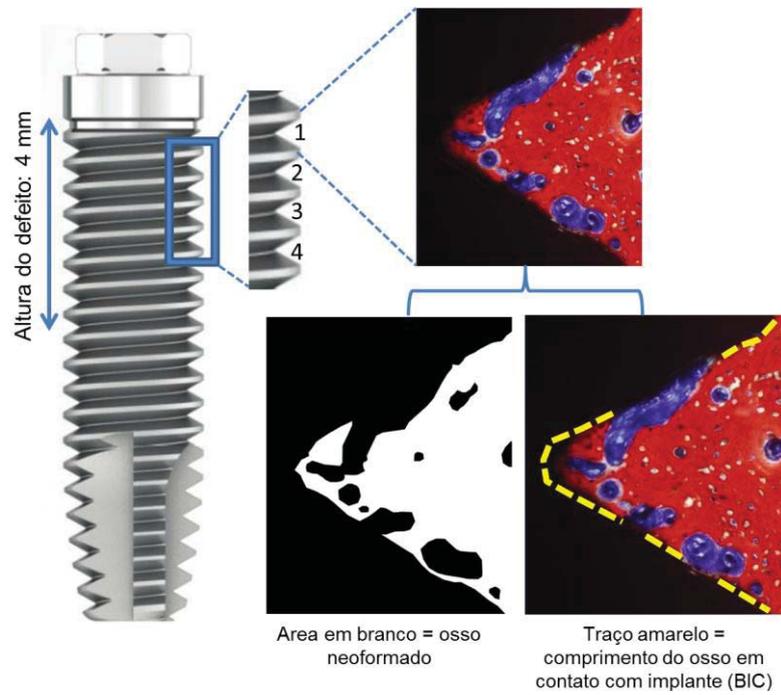


Figura 17 – Análises histomorfométricas

5 RESULTADOS

5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 18 apresenta microestrutura da hidroxiapatita. Observa-se que esta possui um arranjo granular de tamanhos diversos. Esses grãos, quando analisados em maior aumento, possuem uma topografia composta de inúmeros grãos menores agregados (Figura 19 e 20).

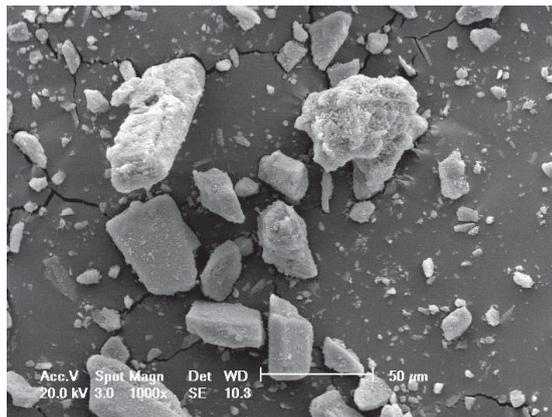


Figura 18 – Imagem de MEV da hidroxiapatita (1000X)

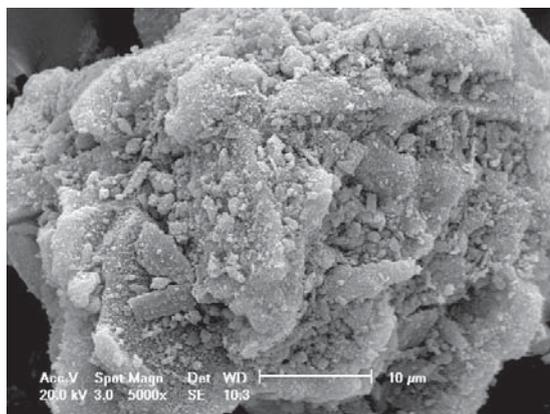


Figura 19 – Imagem de MEV da hidroxiapatita (5000X)

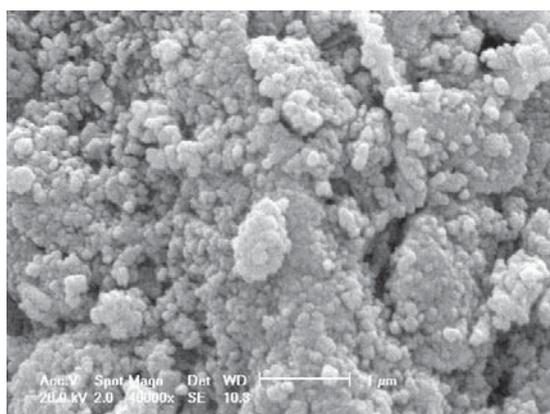


Figura 20 – Imagem de MEV da hidroxiapatita (40000X)

Ao analisar as imagens de MEV da membrana observa-se que a mesma possui o colágeno organizado em forma de trama (Figura 21 e 22) a qual lhe confere uma característica de permeabilidade. A ligação interna na trama é realizada por fibrilas colágenas (Figura 23).

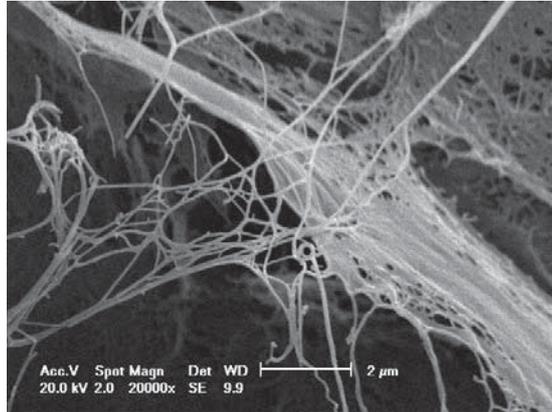


Figura 21 – Imagem de MEV da membrana (20000X)

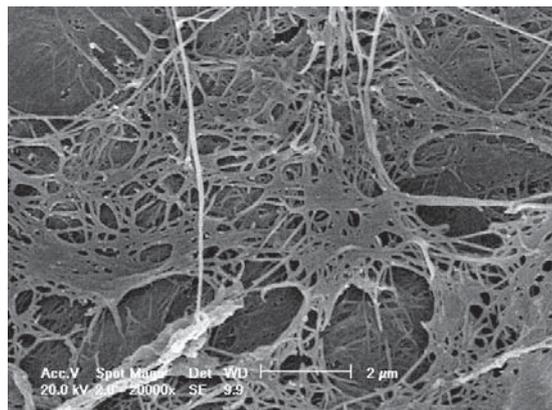


Figura 22 – Imagem de MEV da membrana (20000X)

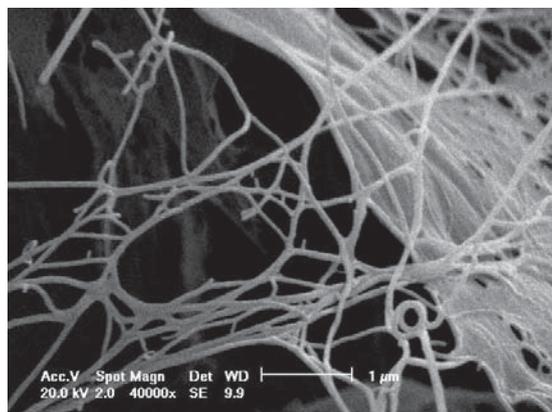


Figura 23 – Imagem de MEV da membrana (40000X)

As imagens da superfície do implante obtidas por MEV mostram uma superfície predominantemente lisa, característica de implantes sem tratamento de superfície (Figura 24). Analisando essa superfície com um aumento maior observa-se rugosidades referentes ao processo de usinagem do implante (Figura 25).

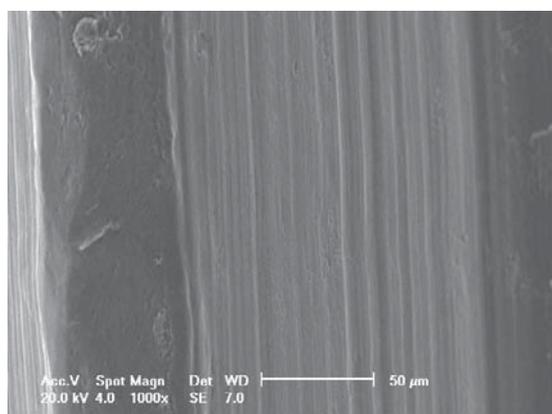


Figura 24 – Imagem de MEV do implante (1000X)

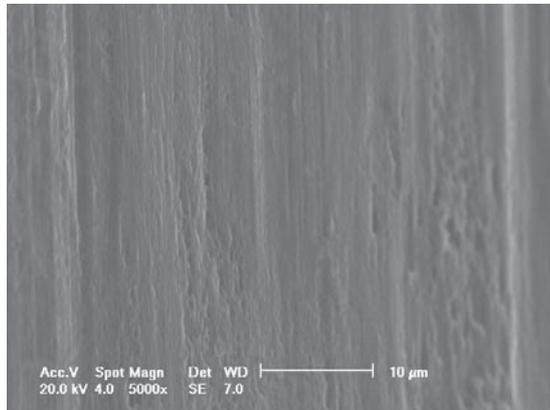


Figura 25 – Imagem de MEV do implante (5000X)

5.2 Altura do tecido ósseo neoformado

A Tabela 2 mostra a altura do tecido ósseo neoformado. Esse valor foi obtido pela diferença entre as profundidades de sondagem obtidas logo após a instalação dos implantes e após o período de tratamento (90 dias). A análise estatística não apontou diferença significativa para o fator uso de CRO e para a interação entre os fatores ($p > 0,05$). Já quando o fator tratamento local foi analisado, foi observada diferença significativa entre os grupos ($p = 0,004$).

Tabela 2 – Valores de média \pm desvio-padrão da altura de osso neoformado (mm) para os tratamentos locais⁴

	Coágulo	Mem	HA	HA+Mem
Com CRO	2,3 \pm 0,5 ^{Aab}	2,1 \pm 0,3 ^{Ab}	3,0 \pm 0,6 ^{Aa}	3,1 \pm 0,6 ^{Aa}
Sem CRO	2,5 \pm 0,0 ^{Aab}	2,3 \pm 0,8 ^{Ab}	3,0 \pm 0,5 ^{Aa}	3,2 \pm 0,6 ^{Aa}

⁴ Médias seguidas de letras maiúsculas semelhantes na coluna não têm diferença estatística. Médias seguidas de letras minúsculas semelhantes na linha não têm diferença estatística ($p > 0,05$).

O grupo HA e HA+Mem apresentaram maior altura de osso neoformado do que o grupo MEM. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos Coágulo e MEM.

5.3 Análises histológica e histomorfométricas

As análises histológicas e histomorfométricas apresentaram resultados semelhantes independente do uso de medicamento sistêmico (Figura 26, 27, 28 e 29). O uso do CRO não foi capaz de promover aumentos significativos na qualidade ou quantidade dos tecidos formados.

É possível perceber que em todos os grupos ocorreu uma formação óssea bastante trabeculada mas que cobre toda a região do implante provida de passos de rosca. Os pontos de cor preta ora presentes sugerem artefatos oriundos da inclusão dos material biológico em resina para obtenção das lâminas (Figura 26 e 27).

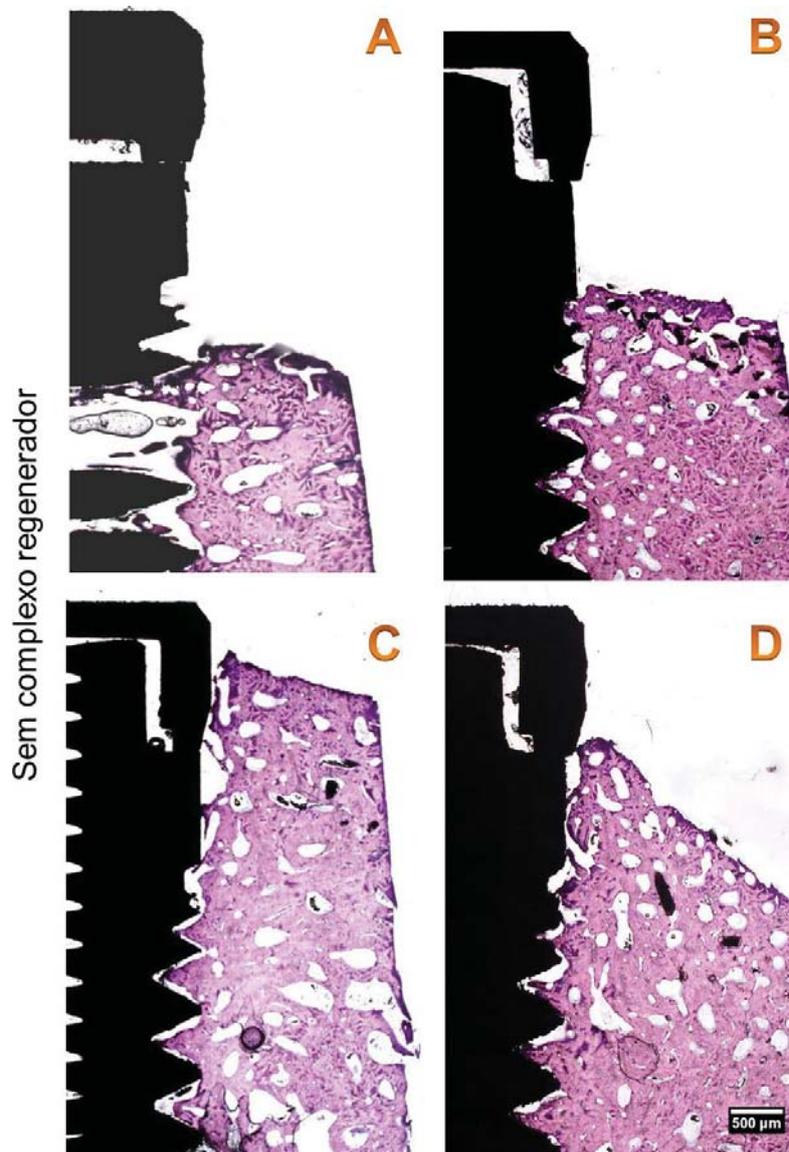


Figura 26– Análise histológica dos tecidos formados sem CRO (A: Coágulo; B: Mem; C: HA e; D: HA+Mem)

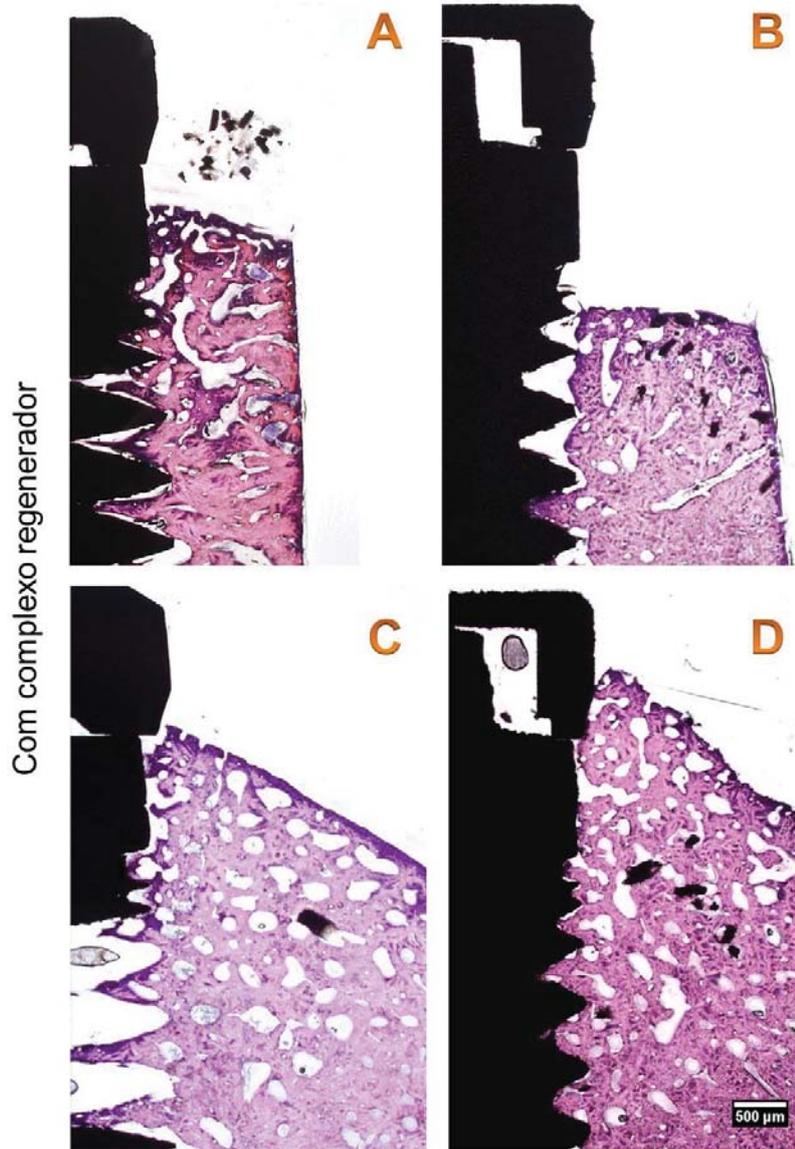


Figura 27– Análise histológica dos tecidos formados com CRO (A: Coágulo; B: Mem; C: HA e; D: HA+Mem)

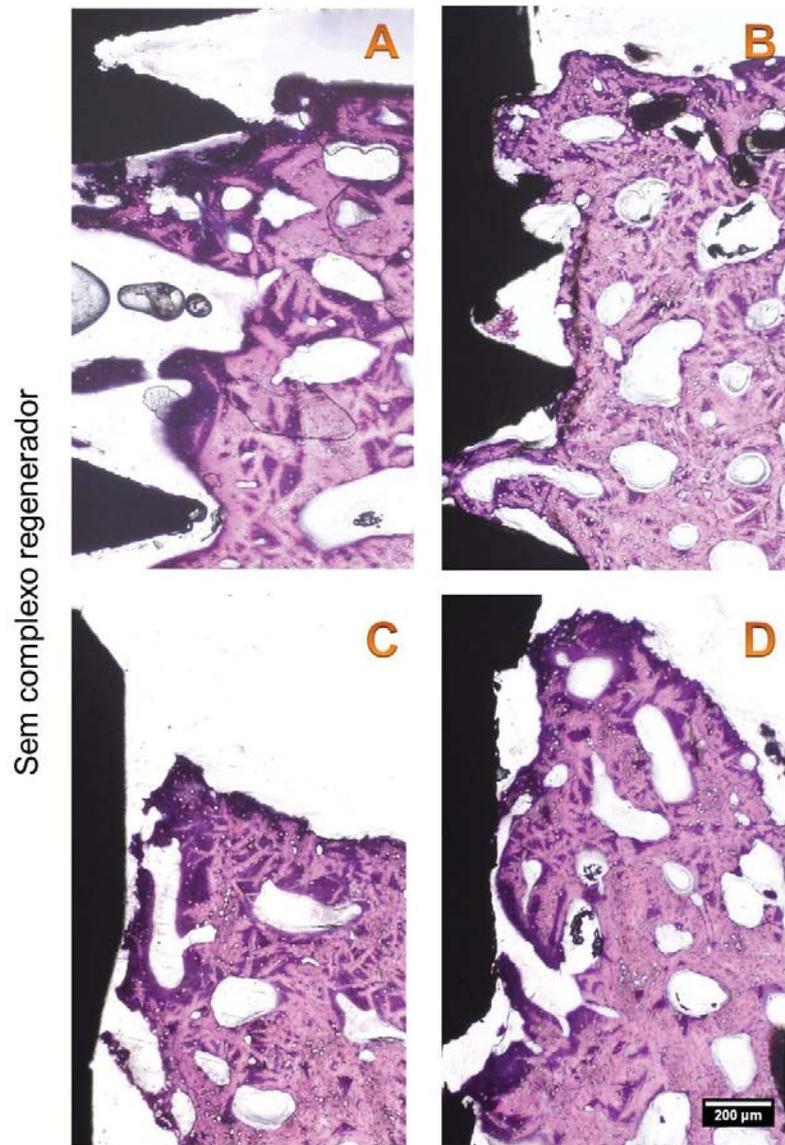


Figura 28– Análise histológica com dos tecidos formados sem CRO (A: Coágulo; B: Mem; C:HA e; D: HA+Mem)

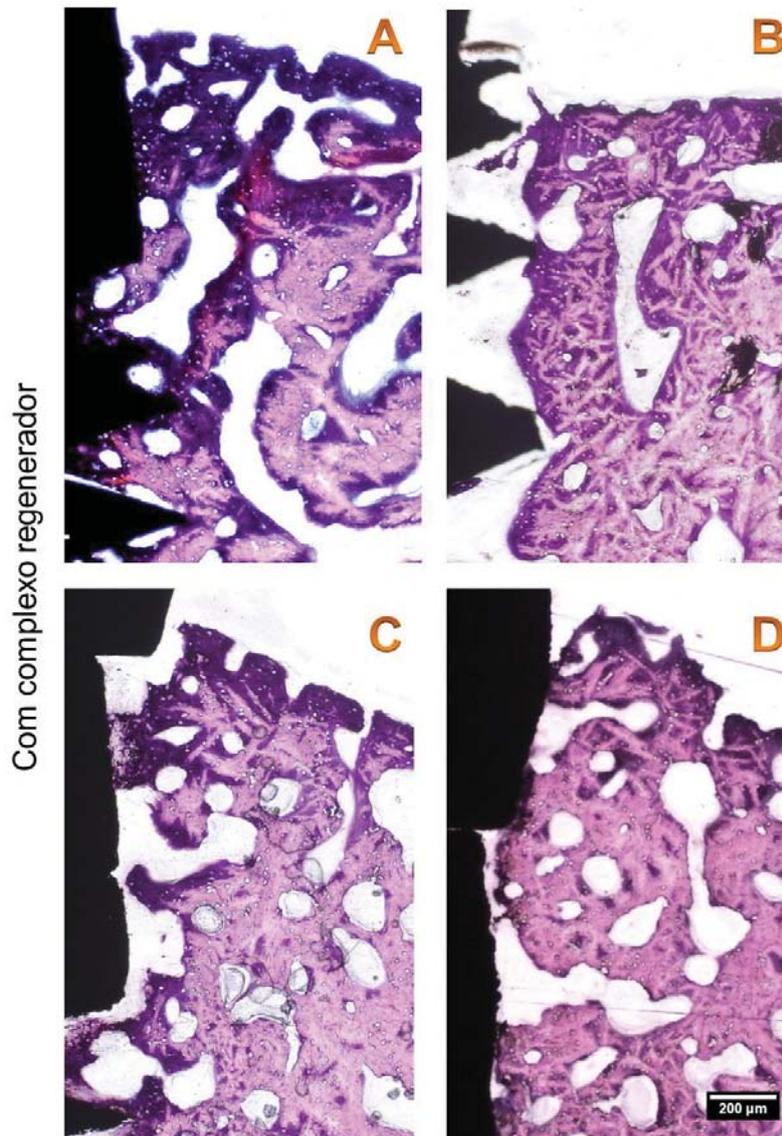


Figura 29– Análise histológica com dos tecidos formados com CRO (A: Coágulo; B: Mem; C:HA e; D: HA+Mem)

O padrão histológico dos tecidos formados na coloração de azul de Stevenel (tecido conjuntivo em azul) e vermelho de alizarina (tecido calcificado em vermelho birrinfrigente) é mostrado na Figura 30 para os cães que não receberam o complexo regenerador e na Figura 31 para aqueles que receberam diariamente. As setas indicam uma zona na qual há a transição de uma zona óssea mais compacta e organizada para outra mais trabeculada. Deve-se ressaltar que ambas as zonas estão contidas dentro da deiscência óssea criada. Essa transição foi observada na maioria das lâminas obtidas entretanto não foi possível estabelecer um padrão de relação entre os tamanhos das zonas ósseas mais e menos organizada entre os grupos. Desta forma, não se pode afirmar que algum dos tratamentos favoreceu a organização e maturação óssea em maior quantidade e/ou velocidade. A Figura 32 mostra em maior aumento as zonas apontadas pelas setas nas figuras anteriores.

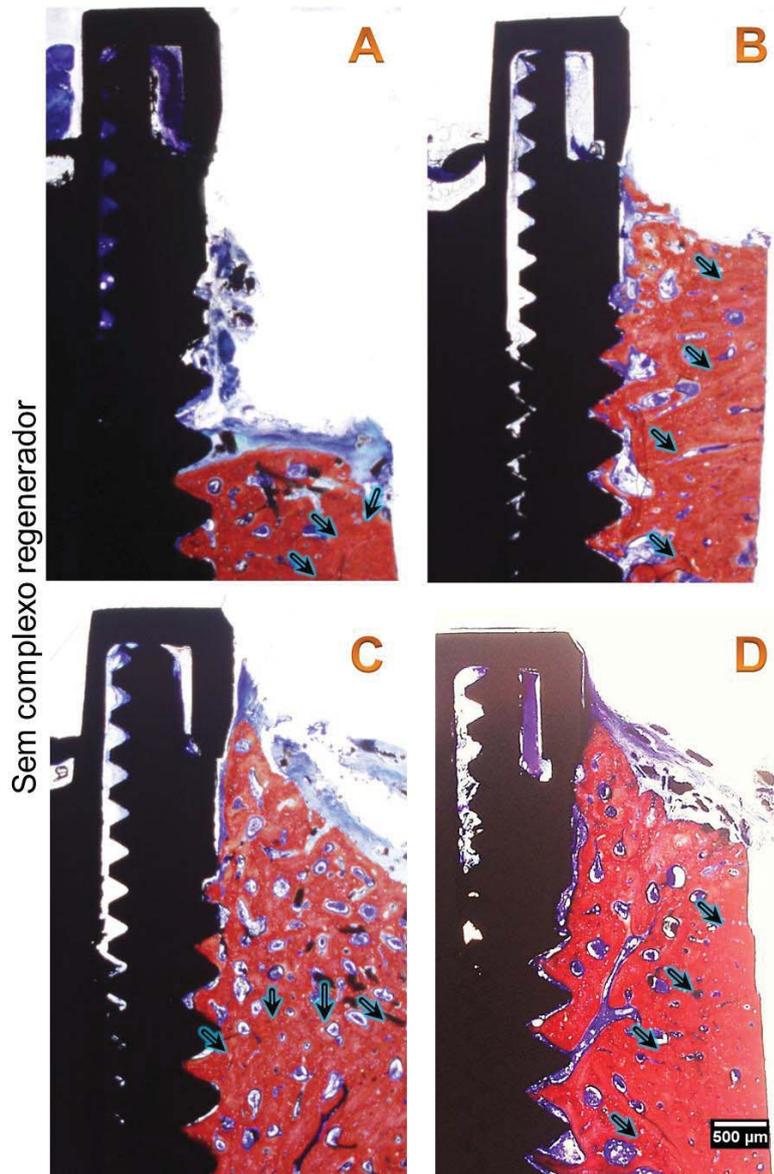


Figura 30– Análise histológica dos tecidos formados sem CRO (A: Coágulo; B: Mem; C:HA e; D: HA+Mem)

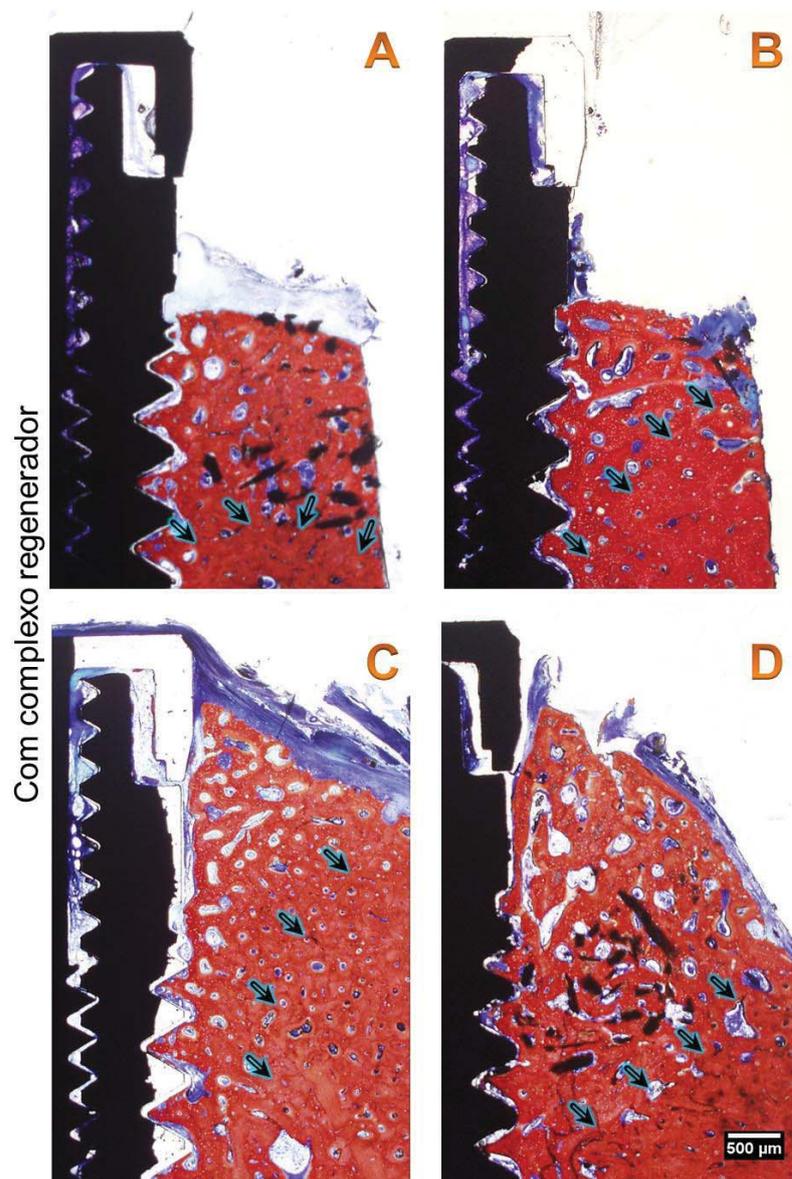


Figura 31– Análise histológica dos tecidos formados com CRO (A: Coágulo; B: Mem; C:HA e; D: HA+Mem)

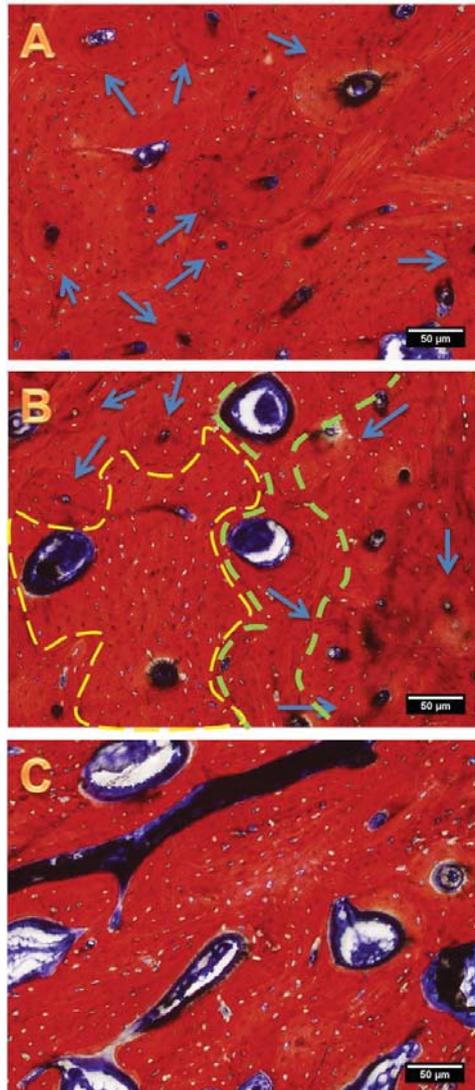


Figura 32– A) zona compacta com canais de Havers organizados (setas azuis); B) zona de transição (entre linhas verdes) e ampla área sem nenhum canal de Havers (tracejado amarelo); C) zona imatura sem canais de Havers

A Figura 33 mostra a formação de osso dentro dos primeiros 4 passos de rosca de cada implante, sendo Rosca 1 o localizado mais próximo da plataforma e Rosca 4 o localizado mais próximo do osso remanescente após a criação do defeito. Com base na série dessas figuras foram determinados a área do passo de rosca ocupada por osso neoformado e o comprimento da superfície do implante em contato com o osso neoformado (*bone-to-implant contact* – BIC).

A Figura 34 mostra a área (μm^2) do passo de rosca ocupada por osso neoformado. Não há diferença estatística para a quantidade de osso formada entre os passos de rosca analisados para nenhum dos tratamentos estudados. Cabe ressaltar que área de cada passo de rosca é de $684 \mu\text{m}^2$.

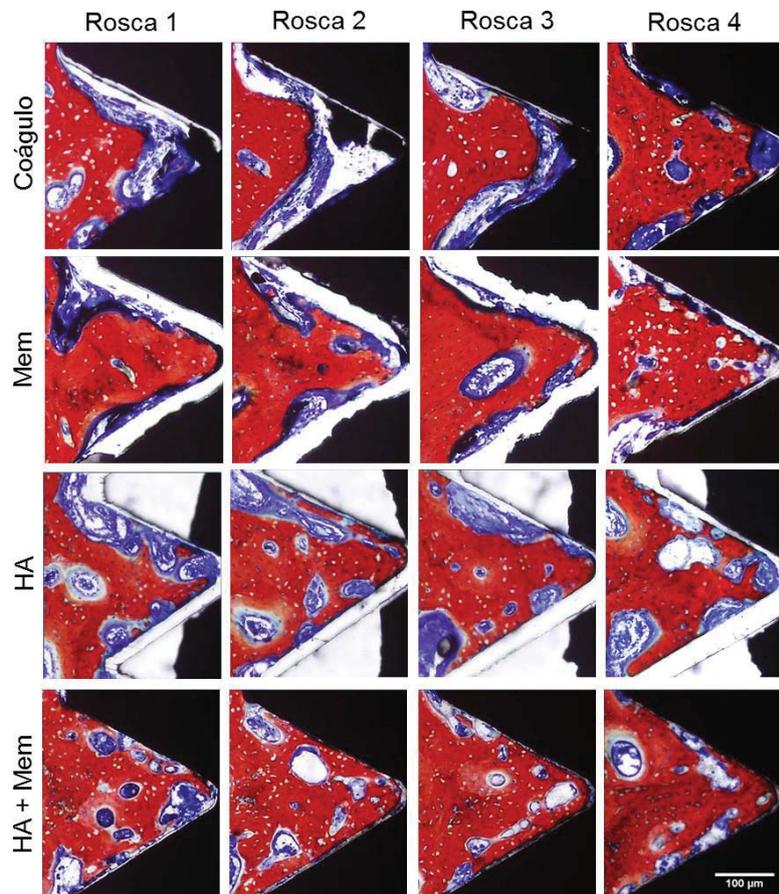


Figura 33 – Análise histológica dos tecidos formados nos passo de rosca com a coloração azul de Stevenel e vermelho de alizarina

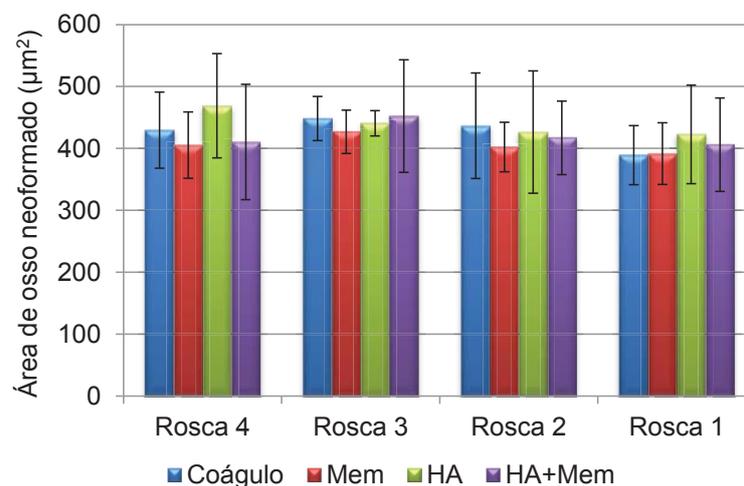


Figura 34 – Área óssea neoformada em cada passo de rosca do implante.

A Tabela 3 mostra a média de osso em contato com o implante – BIC, isto é, a de osteointegração obtida para cada grupo considerando o comprimento de um passo de rosca (660 µm). Foi encontrada diferença estatística entre as roscas ($p < 0,001$). Os grupos HA e HA+Mem apresentaram as maiores médias, estatisticamente semelhante ao grupo Mem. O grupo Coágulo apresentou a menor média de osteointegração.

Tabela 3 – Média do comprimento (µm) de BIC por passo de rosca⁵

Grupo	Coágulo	Mem	HA	HA+Mem
Média (DP)	175,0 (102,4) ^b	206,7 (102,1) ^{ab}	275,3 (118,4) ^a	269,4 (93,6) ^a

⁵ Médias seguidas de letras semelhantes não têm diferença estatística ($p > 0,05$)

A Figura 35 mostra o comprimento (μm) de BIC para cada grupo experimental considerando separadamente cada passo de rosca. Foi realizado o teste de Anova de um fator para verificar a influência do fator passo de rosca para cada tipo de tratamento isoladamente e não foi encontrada diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$). Também foi realizado o teste de Anova de um fator para verificar a influência do fator tratamento para cada tipo de rosca isoladamente e não foi encontrada diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$). Cabe ressaltar que o comprimento máximo de BIC possível é de $660 \mu\text{m}$.

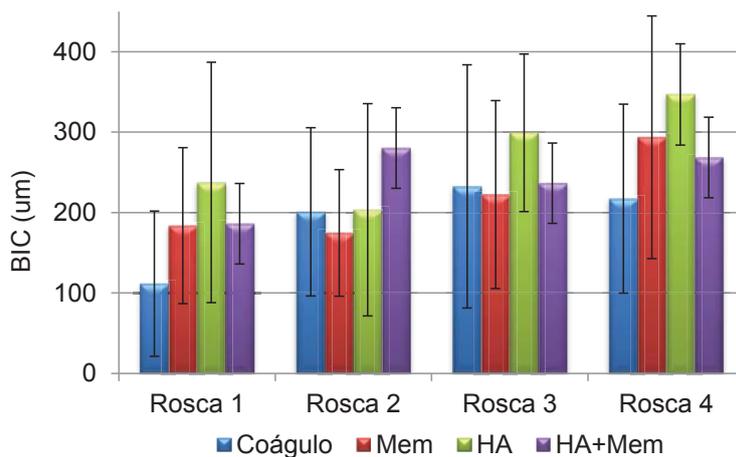


Figura 35 – Comprimento da rosca do implante em contato com o osso

A Tabela 4 mostra a porcentagem de osso osseointegrado em relação à quantidade de osso neoformado para cada passo de rosca calculado separadamente.

Tabela 4– Porcentagem do comprimento do passo de rosca em contato com osso em função da quantidade de osso neoformado

	Rosca 1	Rosca 2	Rosca 3	Rosca 4
Coágulo	29,5	47,4	53,4	52,2
Mem	48,3	44,7	53,7	74,6
HA	55,4	50,3	66,1	84,6
HA+Mem	47,2	69,2	53,9	67,4

6 DISCUSSÃO

Com a crescente urbanização e mudanças nos estilos de vida, a sociedade expressa preocupações específicas com o uso de cães em pesquisa, uma vez que em muitos casos estes possuem um status especial para os seres humano. De fato, os cães têm sido cada vez mais considerados membros da família. Aproximadamente 20.000 cães são sujeitos de pesquisa na Europa todos os anos, e suas características genéticas, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais suportam o seu uso como modelo experimental (HASIWA *et al.*, 2011).

No presente estudo, foram tomados todos os cuidados para garantir o bem-estar dos animais antes, durante e após os procedimentos relacionado a pesquisa. O mundialmente reconhecido trinômio 3R – Replacement, Reduction and Refinement (redução, refinamento e substituição) em pesquisas com animais foi amplamente discutido pelos pesquisadores e adotado antes do início da pesquisa. Assim, o baixo poder de algumas análises estatísticas realizadas no presente estudo pode ser justificado pelo reduzido número de animais avaliados. Deve-se gizar que nessa pesquisa optou-se por manter vivos os cães após as remoções dos espécimes para análise, ao contrário de outros estudos onde houve o sacrifício dos cães (BOTTICELLI *et al.*, 2004; SCHWARZ *et al.*, 2008; CHO *et al.*, 1998 e STENTZ *et al.*, 1997). A decisão gerou uma série de cuidados adicionais como instalação de placas de titânio para reforçar a estrutura óssea após a retirada dos implantes e aumento dos custos financeiros da pesquisa com a adição de

hidroxiapatita nas feridas como tentativa de acelerar o processo de osteogênese.

Clinicamente a resposta dos cães frente a instalação dos implantes nos fêmures foi favorável em todos os grupos. Não foram observados abscessos, supuração, processos inflamatórios ou reações alérgicas. Não houve exposição das membranas; resultado semelhante ao de Casati *et al.* (2002). Em contraste, Lee *et al.* (2012) relatam a ocorrência de exposição de 20% das membranas instaladas sobre os implantes devido a traumas mastigatórios. Coletivamente, a escolha do fêmur parece ser uma boa maneira de estudar fenestrações em implantes dentários, uma vez que estes ficam abrigados do meio externo por uma espessa camada muscular além da pele.

De um modo geral, ao interpretar os presentes resultados, deve-se levar em conta que os dados obtidos a partir desta pesquisa foram realizados em cães, e desta maneira as extrapolações clínicas devem ser feitas com cautela uma vez que a taxa de remodelação óssea em cães é aproximadamente quatro vezes mais rápida do que a de seres humanos (SCHWARZ, *et al.*, 2008 e PEARCE *et al.*, 2007).

Optou-se por usar implantes dentários em cães com desenho, tamanho e diâmetro compatíveis com os encontrados no mercado e que comumente são usados na clínica odontológica ou empregados em pesquisas. A geometria do implante (desenho, tamanho e diâmetro) foi selecionada visando-se obter estabilidade primária no momento da instalação no fêmur (PEARCE *et al.*, 2007), sendo um dos pré-requisito para se obter osseointegração (SHIGEISHI *et al.*, 2012). Os implantes utilizados tinham 3,3 mm de diâmetro para que houvesse espaço para os tratamentos locais dos defeitos criados. Implantes com diâmetro maior

(4,1 ou 5,0 mm) poderiam gerar problemas devido a pequena largura do fêmur dos cães. O comprimento de 10 mm foi escolhido afim de respeitar a pequena espessura óssea do fêmur e evitar fraturas devido aos estresses aos quais esses ossos estão sujeitos. Na instalação dos implantes, foi observada dificuldade em obter estabilidade primária em três implantes devido à característica estrutural do fêmur dos cães que possui bastante osso medular com pouca espessura cortical (STENTZ *et al.*, 1997). Esses implantes foram retirados logo após a tentativa frustrada de instalação, os defeitos foram reparados e os cães excluídos do estudo.

Considerando todos os grupos e estimativas realizadas (altura de defeito, área de osso neoformado, BIC) não houve diferença estatística entre os grupos com e sem medicamento. O CRO utilizado tinha como principal princípio ativo o sulfato de condroitina A, um glicosaminoglicano (GAG) importante no controle das perdas qualitativas e quantitativas da degeneração articular. O tecido ósseo contém menos de 1% de GAG (MANIA *et al.*, 2009), os quais consistem em 90% de 4-sulfato de condroitina (C4S) e pequenas quantidades de ácido hialurônico, 6-sulfato de condroitina (C6S) e dermatan sulfato (PRINCE *et al.*, 1983).

Células precursoras de diferenciação osteoblástica, como células-tronco mesenquimais (mesenchymal stem cells – MSC), são recrutadas da medula óssea para o local de formação óssea onde elas se diferenciam, sintetizam e mineralizam matriz extracelular. Quando diferenciadas em células osteoblásticas-símile *in vitro*, MSC passam por três fases: proliferação; síntese e maturação da matriz extracelular e mineralização (PITTENGER, 2008). A transição da fase proliferativa

para a diferenciativa é caracterizada pela elevada síntese de matriz óssea orgânica incluindo GAG e proteoglicanos (BECKER *et al.*, 2002).

A importância de GAG para diferenciação osteoblástica foi avaliada em diversos estudos *in vitro* e muitos dos resultados obtidos são contrastantes. Osteoblastos e várias linhas de células de osteosarcomas responderam às GAG com uma diminuição da proliferação de uma maneira dose-dependente (DOMBROWSKI *et al.*, 2009 e NIKITOVIC *et al.*, 2005). A condroitina E suprasulfatada natural apresentou efeitos positivos na deposição de colágeno, atividade de fosfatase alcalina tecidual inespecífica e acúmulo de minerais em osteoblastos (MIYAZAKIS *et al.*, 2008) enquanto a elevação do PG contendo sulfato de condroitina interferem na mineralização (CHEN *et al.*, 1985), indicando um papel crítico da sulfatação do sulfato de condroitina na mineralização óssea (SALBACH *et al.*, 2012).

Essas diferentes respostas de deposição de matriz extracelular e mineralização frente a diferentes doses e componentes, sugere que o medicamento utilizado nesta pesquisa não proporcionou melhores resultados comparado ao grupo sem medicamento por necessitar de ajustes na composição.

Deve-se lembrar que a composição foi estabelecida conforme produtos comerciais existente no mercado para tratamento de defeitos osseoarticulares em cães, por isso estudos preliminares para verificar a eficácia das concentrações não foram efetuados. Ainda, é possível especular que o medicamento possa ter tido um efeito benéfico na velocidade de reparação óssea, mas o fato dos implantes terem permanecidos por 90 dias em posição pode ter mascarado esse efeito, sendo tempo suficiente para o organismo, mesmo sem o estímulo

externo, ter condições de reparar o defeito ao mesmo nível do grupo que recebeu a medicação.

O fato de não existir dados de um período de avaliação inferior a 90 dias não nos permite afirmar com maior veemência a presença de um efeito benéfico do medicamento sistêmico, uma vez que os grupos com medicamento e controle não apresentaram diferenças nas avaliações qualitativas e quantitativas. Em tempo, deve-se lembrar que as MSC residem na medula óssea de ossos longos, como o fêmur, em contato com células endoteliais, adipócitos e osteoblastos (AUGELLO *et al.*, 2010). Novamente, o longo tempo de espera empregado nessa pesquisa pode ter criado condições para que as MSC, abundantes próximas a região dos defeitos, tenham tido condições de migrar, diferenciar e reparar os defeitos em níveis equiparáveis ao grupo que recebeu o medicamento. Dessa forma, pode ser aventada a idéia de que a influência do tempo no processo natural de osteocicatrização pode ter sobrepujado a influência do medicamento. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para confirmar isso. Fato é que mesmo sem medicamento, o tempo de 90 dias foi suficiente para promover formação óssea em níveis adequados em todos os grupos avaliados (Tabela 2).

Ainda, se for considerado que clinicamente os implantes dentários são instalados em osso com pouca medula óssea, e conseqüentemente os efeitos da disponibilidade local do medicamento possivelmente são ainda menores, causa descrédito aventar que um medicamento que não promoveu diferenças substanciais em um local rico em MSC possa trazer algum benefício após 90 dias em um sítio com menor disponibilidade dessas células. Entretanto isso é apenas uma hipótese que carece de maiores investigações.

Stentz *et al.* (1997a) relatam que qualquer defeito criado na mandíbula de cães, com mais de 3 mm de largura, são suficientemente grandes para evitar a regeneração espontânea somente com estímulos vindo do coágulo a curto prazo (menos de 3 semanas). Cho *et al.* (1998) e Schwarz *et al.* (2008) mostraram que um defeito na mandíbula quase se regenera em 12 semanas de tratamento após a aplicação de biomaterial como a hidroxiapatita ou utilização de implantes com tratamento superficial como *spray* de plasma.

Nas Figura 26, 27, 30 e 31 é possível perceber a presença de uma área óssea compacta localizada apicalmente a plataforma e outra trabeculada mais próxima a plataforma do implante. Uma típica representação das três áreas envolvidas na neoformação óssea (osso compacto, transição e trabeculado) é mostrado na Figura 32. Essas três áreas foram igualmente identificadas em outros estudos (ALLEGRINI *et al.*, 2006 e SCHWARZ *et al.*, 2010). Via de regra, a angiogênese e a formação de novo osso surgem em espaços abertos da medula óssea ou também denominado de osso trabeculado (SCHWARZ *et al.*, 2008). Esse osso por si tem uma baixa resistência mecânica o que aumenta os riscos de fratura e perda dos implantes. Mas quando esse osso recebe estímulos mecânicos graduativos ele se torna maduro e com um sistema de canais de Havers bastante desenvolvido (ALLEGRINI *et al.*, 2005) como observado na Figura 32. Os canais de Havers são propícios ao depósito de sal mineral que conferem maior resistência ao tecido ósseo (KIMELMAN *et al.*, 2007).

Não foi possível estabelecer um padrão de proporção entre osso compacto/trabecular para os grupos estudados, entretanto, quanto maior

for o tempo de espera, mais organizado, compacto e resistente se torna o osso neoformado (ALLEGRIINI *et al.*, 2005).

Os dados da Figura 34 mostraram que em 12 semanas a quantidade e qualidade da regeneração óssea foi a mesma para todos os grupos estudados. Schwarz *et al.* (2007a) observaram que após 8 semanas do início da RTG em defeitos na mandíbula de cães, já era possível ver o preenchimento contínuo do tecido ósseo em todos os grupos estudados⁶.

A organização da área do defeito é de importância crucial para a proliferação dos vasos sanguíneos que viabilizam o processo de regeneração óssea. Schwarz *et al.* (2008) mostraram vasta angiogênese na área das fenestrações entre 4 e 8 semanas. Entretanto após 24 semanas esse fenômeno não foi mais observado.

A membrana reabsorvível vem sendo amplamente utilizada para o tratamento deste tipo de defeito, uma vez que evita a segunda intervenção cirúrgica que é necessária quando se utiliza as membranas de tetrafluoretileno. A instalação da membrana reabsorvível foi realizada afim de conter o coágulo no defeito e impedir a penetração de tecido de granulação no local. A presença do coágulo estimula o recrutamento de leucócitos mononucleares que irão estimular a deposição de matriz extracelular; a liberação e ativação de mediadores fibrogênicos e a deposição de tecido fibrovascular, culminando no fenômeno de angiogênese.

⁶ controle (coágulo); membrana Bio Gide®; Membrana bi-camadas (protótipo); membrana Biomend Extend® (bi-camadas); hidroxiapatita (Ossix®); membrana reforçada por titânio e membrana de politetrafluoretileno

No presente estudo o grupo Mem não apresentou melhores resultados comparado ao grupo Coágulo considerando a altura da regeneração (Tabela 2). Isso pode ter ocorrido pela membrana ter sido comprimida a superfície do implante, não havendo assim espaço para o encapsulamento do coágulo abaixo dela (LEE *et al.*, 2012).

Além disso, a membrana reabsorvível utilizada no presente estudo é reabsorvida após um período de 4 a 6 semanas⁷. Lee *et al.* (2012) relatam vestígios da membrana de colágeno em até 8 semanas. Com a reabsorção, o efeito de barreira pode ter diminuído a ponto de não contribuir para uma regeneração óssea maior do que a encontrada para o grupo Coágulo (YEH e HSU, 2003). Deve-se também salientar que a ausência de agentes de fixação para estabilizar a membrana e manter o coágulo encapsulado e imóvel, pode ter influenciado negativamente na regeneração óssea. Neste contexto, em ambos os casos (reabsorção ou falta de fixação) pode ter ocorrido uma invaginação de células de tecido conjuntivo para o interior da ferida criada (SCHWARZ *et al.*, 2008), de modo a não se criar diferença entre os grupos Mem e Coágulo.

Considerando as Figura 26 e 27, é possível notar que a hidroxiapatita foi completamente substituída por nova formação óssea. Essa reabsorção é feita por macrófagos e células gigantes multinucleadas. Brunel *et al.* (2001) relatam que na região onde ocorre a formação óssea por osteoindução com esse biomaterial é comum encontrar grânulos residuais de hidroxiapatita, ativa reabsorção óssea e osteócitos, demonstrando ativo processo de remodelação óssea.

⁷ Informações do fabricante

A desintegração das partículas da hidroxiapatita pode resultar numa concentração temporária elevada de íons de cálcio na zona do defeito, e isso pode conduzir a maturação dos osteoblastos a curto prazo durante o processo de regeneração (LEE *et al.*, 2012). Isso poderia explicar a maior altura de neoformação, bem como a maior área e BIC em ambos grupos com hidroxiapatita (HA e HA+Mem) comparados aos grupos Coágulo e Mem.

Ao analisar os valores obtidos para BIC, é possível perceber que os grupos HA e HA+Mem promoveram o maior comprimento de contato entre o implante e o tecido neoformado. Este é um resultado importante uma vez que mostra que o uso da hidroxiapatita não somente é capaz de induzir maior formação óssea em altura (Tabela 2), mas também de estimular a interação do osso neoformado com a superfície do implante. Se considerarmos as porcentagens expressas na Tabela , podemos observar que para a rosca 4 (a mais distante do osso remanescente) a porcentagem do comprimento do passo de rosca em contato com osso em função da quantidade de osso neoformado, foi aproximadamente 50% maior nos grupos com hidroxiapatita (HA e HA+Mem) do que os encontrados no grupo Coágulo. Isso mostra que a hidroxiapatita não somente estimula a maior formação de osso em altura, mas também cria condições para que este osso se osseointegre mais precocemente.

7 CONCLUSÃO

A hipótese do estudo foi rejeitada uma vez que o uso do CRO não foi capaz de apresentar melhoras em nenhum dos parâmetros avaliados. A hidroxiapatita associada ou não à membrana possui capacidade de aumentar a altura de osso formado bem como o comprimento de osso em contato com implante.

8 REFERÊNCIAS

ADAM, J.; OPPENHEIMER, M. D.; LAWRENCE, T.; STEVEN, R. B. Craniomaxillofac trauma reconstruction. *Craniofacial Bone Grafting: Wolff's Law Revisited*, v. 1, n. 1, p. 49–61, 2008.

ALEXANDER, H.; PARSONS, JR.; RICCI, J. L.; BAJPAI, P.; WEISS, A. B. Calcium phosphate ceramic-based composites as bone graft substitutes. In: *Critical Reviews on Biocompatibility*, CRC Press, v. 4, n. 1, p. 43-77, 1987.

ALLEGRINI, Jr. S.; RUMPEL, E.; KAUSCHKE, E.; FANGHÄNEL, J.; KÖNIG Jr. B. Hydroxyapatite grafting promotes new bone formation and osseointegration of smooth titanium implants. *Annals of Anatomy*, Regensburg, v. 188, n. 2, p. 143-151, 2006.

ALVES, A. Histopathological analysis: reasons for delayed results. *Sociedade Portuguesa Ciências Veterinárias*, 10-12 Out. 2002, p. 239-247.

ANDRADES, J. A.; CLAROS, S.; JIMÉNEZ, P. P.; LÓPEZ P. J. M^a.; ZAMORA N. P.; GUERADO, E et al. Skeletal regeneration by mesenchymal stem cells: what else? *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*, Rijeka, InTech, cap. 5, p. 107-144, 2010.

AKAGAWA, Y.; BERGLUNDH, T.; BUSER, D.; LINDHE, J. Initial bone regeneration around fenestrated implants in beagle dogs using basic fibroblast growth factor–gelatin hydrogel complex with varying biodegradation rates. *Journal of Prosthodontic Research*, v. 53, n. 1, p. 41-47, 2009.

ARTZI, Z.; GIVOL, N.; ROHRER, M. D.; NEMCOVSKY, C. E.; PRASAD, H. S.; TAL, H. Qualitative and quantitative expression of bovine bone mineral in experimental bone defects. Part 1: Description of a dog model and histological observations. *Journal of Periodontology*, v. 74, n. 8, p. 1143-1152, 2003.

_____. Qualitative and quantitative expression of bovine bone mineral in experimental bone defects. Part 2: Morphometric analysis. *Journal of Periodontology*, v. 74, n. 8, p. 1153-1160, 2003.

AUGELLO, A.; KURTH, T. B.; BARI, DE C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *European Cells and Materials Journal*, v. 1, n. 20, p. 121-133, 2010.

BAIERLE, J.; VALENTINI, C. P.; MORO, A.; BARBOSA, F. Jr.; GARCIA, S. C. Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 46, n. 6, p. 463-470, 2010.

BARBOSA, J. R. D.; EDUARDO, C. L. C. M., FERREIRA, J.; MUNIZ, R. Complicações no tratamento com implantes osseointegrados. Fase Cirúrgica. *Revista Brasileira de Implantodontia*, v. 15, n. 1, p. 14-18, 2009.

BECKER, D.; GEISSLER, U.; HEMPEL, U.; BIERBAUM, S.; SCHARNWEBER, D.; WORCH, H. et al. Proliferation and differentiation of rat calvarial osteoblasts on type I collagen-coated titanium alloy. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 59, n. 3, p. 516-527, 2002.

BOTTICELLI, D.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Resolution of bone defects of varying dimension and configuration in the marginal portion of the peri-implant bone. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 31, n. 4, p. 309-317, 2004.

BUSER, D. Guided bone regeneration in implant dentistry, Second Edition. Quintessence Publishing Co, Inc Chicago, Berlin, Tokyo, London, Paris, Milan, Barcelona, Istanbul, São Paulo, New Delhi, Prague and Warsaw, p. 138-39, p. 86-7; p. 1-14, 2009.

BUEMI, M.; GALEANO, M.; STURIALE, A.; LENTILE, R.; CRISAFULLI, C.; PARISI, A. et al. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock*, v. 22, n. 2, p. 169-173, 2004.

BRÂNEMARK, P. I.; BREIME, U.; ADELL, R.; HANSSON, B. O.; LINDSRÖM, J.; OHLSSON, Å. Intra osseous anchorage of dental prostheses: I. Experimental Studies. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 3, n. 2, p. 81-100, 1969.

BRANDÃO, A. C.; BRENTAGANI, L. G.; NOVAES, A. B. Jr.; GRISI, M. F. M.; SOUZA, S. L. S.; TABA, M. Jr. et al. Histomorphometric analysis of rat alveolar wound Healing with hydroxyapatite alone or associated to BMPs. *Brazilian Dental Journal*, v. 13, n. 3, p. 147-154, 2002.

BRUNEL, G.; BROCARD, D.; DUFFORT, J. F.; JACQUET, E.; JUSTUMUS, P.; SIMONET, T. et al. Bioabsorbable materials for guided bone regeneration prior to implant placement and 7-year follow-up: report of 14 cases. *Journal of Periodontology*, , v. 72, n. 2, p. 257-264, 2001.

CASATI, M. Z.; SALLUM, E. A.; NOCITI, Jr. F. H.; CAFESSE, 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. *Journal of Periodontology*, v. 73, n. 7, p. 789-796, 2002.

CHAI, W. I. A systematic review on the management of osseous defects during dental implant placement. *The Annals of Dentistry of the University of Malaya*, v. 16, p. 24-30, 2009.

CHEN, C. C.; BOSKEY, A. L. Mechanisms of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite growth. *Calcified Tissue International*, v. 37, n. 4, p. 395-400, 1985.

CHIAPASCO, M.; ZANIBONI, M. Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri-implant dehiscences and fenestrations: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research*, v. 20, n. 4, p. 113-123, 2009.

CHO, K. S.; CHOI, S. H.; HAN, K. H.; CHAI, J. K.; WIKESJO, U. M. E. et al. Alveolar bone formation at dental implant dehiscence defects following guided bone regeneration and xenogeneic freeze-dried demineralized bone matrix. *Clinical Oral Implants Research*, v. 9, n. 6, p. 419 -428, 1998.

CLARKE, R. A.; BROOKS, P. T. H.; LEE, R. N. Bone growth into a ceramic-filled defect around an implant. The Response to Transforming Growth Factor β 1. *Journal of Bone and Joint Surgery*, v. 86, n. 1, p. 126-134, 2004.

CLARK, C. C.; RICHARDS, C. F.; IOZZO, R. V. Posttranslational alterations in newly synthesized cartilage proteoglycans induced by the glutamine analogue 6-diazo-5-oxo-L-norleucine. Time course of inhibition and recovery. *Biochemical Journal*, v. 15, n. 273, p. 283-288, 1991.

CONSTANCE, R. CHU; MICHAL, S.; STEPHEN, B.B. A. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue engineering, Part B*, v. 16, n.1, p. 105-115, 2010.

DENNY, R. D.; BUTTERWORTH, S. J. Cicatrização óssea. In: *Cirúrgica Ortopédica de Cães e Gatos*. 4ª ed. São Paulo: Roca Ltda, p. 2-13, 2006.

DELIGIANNI, D. D.; NATSALA, N. D.; KOUTSOUKOS, P. G.; MISSIRLIS, Y. F. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*, v. 22, n. 1, p. 87-96, 2001.

DI PILLO, L.; RAPOPORT, A. Importância da lateralização do nervo alveolar inferior para os implantes mandibulares. *Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça Pescoço*, v. 38, n. 3, p. 166-170, 2009.

DOMBROWSKI, C.; SONG, S. J.; CHUAN P, L. X.; SUSANTO, E.; SAWYER, A. A.; WOODRUFF, M. A. et al. Heparan sulfate mediates the proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, v. 18, n. 4, p. 661-670, 2009.

ELLIS, J. M.; FOLKERS, K.; MINADEO, M.; VANBUSKIRK, R.; XIA, L. J.; TAMAGAWA, H. A deficiency of vitamin B6 is a plausible molecular basis of the retinopathy of patients with diabetes mellitus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 179, n. 1, p. 615-619, 1991.

ERSANLI, S.; OLGAC, V.; LEBLEBICIOGLU, B. Histologic analysis of alveolar bone following guided bone regeneration. *Journal of Periodontology*, v. 75, n. 5, p. 750–756, 2004.

FERRARIS, M. E. G.; MUÑOZ, A. C. Cemento, ligamento periodontal e osso alveolar. In: *Histologia e embriologia bucodental*. 2 ed. Buenos Aires: Panamericana, 2006. p. 333-334.

FRIEDMANN, A.; STRIETZEL, F. P.; MARETZKI, B.; PITARU, S.; BERNIMOULIN, J. P. Histological assessment of augmented jaw bone utilizing a new collagen barrier membrane compared to a standard barrier membrane to protect a granular bone substitute material. *Clinical Oral Implants Research*, v. 13, n. 6, p. 587–594, 2002.

GARLAND, H. O. New experimental data on the relationship between diabetes mellitus and magnesium. *Magnesium Research*, v. 5, n. 3, p. 193-202, 1992.

HASIWA, N.; BAILEY, J.; CLAUSING, P.; DANESHIAN, M.; EILERAAS, M.; FARKAS, S. et al. Critical evaluation of the use of dogs in biomedical research and testing in Europe. *Alternatives to Animal Experimentation*, v. 28, n. 4, p. 326-340, 2011.

HUNT, D.R.; JOVANOVIĆ, S.A. Autogenous bone harvesting: A chin graft technique for particulate and monocortical bone blocks. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, v. 19, n. 2, p. 165-173, 1999.

JUNQUEIRA, C. L.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In: *Histologia Básica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 136-153.

JOHNSON, K. A study of the dimensional changes occurring in the maxilla following tooth extraction. *Australian Dental Journal*, v. 14, n. 4, p. 241-244, 1969.

KIMELMAN, N.; PELLED, G.; HELM, G. A.; HUARD, J.; SCHWARZ, E. M.; GAZIT, D. Review: gene-and stem cell-based therapeutics for bone regeneration and repair. *Tissue engineering*, v. 13, n. 6, p. 1135-1150, 2007.

KLOKKEVOLD, P. R.; HAN, J. J.; CAMARGO, P. M. Aesthetic management of extractions for implant site development: Delayed versus staged implant placement. *Practical Periodontics and Aesthetic Dental*, v. 11, n. 5, p. 603-610, 1999.

LEE, J. S.; KO S. H.; KIM, Y. U. T.; JUNG, U. W.; CHOI, S. H. Guided bone regeneration using cyanoacrylate-combined calcium phosphate in a dehiscence defect: A histologic study in dogs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 70, n. 9, p. 2070-2079, 2012.

LUNDGREN, D.; NYMAN, S.; MATHIESEN, T.; ISAKSSON, S.; KLINGE, B. Guided tissue regeneration of cranial defects, using biodegradable barriers: an experimental pilot study in the rabbit. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, v. 20, n. 6, p. 257-260, 1992.

MACHADO, C. P. G.; PINTOR, A. V. B.; GRESS, A.; ROSSI, M. A.; GRANJEIRO, M. J.; MAIA, C. D. M. Avaliação da hidroxiapatita contendo estrôncio como substituto ósseo em tíbias de ovelhas. *Innovations Implant Journal*, v. 5, n. 1, p. 9-14, 2010.

MANIA, V. M.; KALLIVOKAS, A. G.; MALAVAKI, C.; ASIMAKOPOULOU, A. P.; KANAKIS, J.; THEOCHARIS, A. D. et al. A comparative biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in human orthotopic and heterotopic bone. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, v. 61, n. 4, p. 447-452, 2009.

MARZOLA, C. *Fundamentos de cirurgia buco maxilo facial*. CDR, Bauru: Ed. Independente, 2005.

MOSES, O.; PITARU, S.; ARTZI, Z.; NEMCOVSKY, C. E. Healing of dehiscence-type defects in implants placed together with different barrier membranes: a comparative clinical study. *Clinical Oral Implants Research*, v. 16, n. 2, p. 210-219, 2005.

MIYAZAKI, T.; MIYAUCHI, S.; TAWADA, A.; ANADA, T.; MATSUZAKA, S.; SUZUKI, O. Oversulfated chondroitin sulfate-E binds to BMP-4 and enhances osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, v. 217, n. 3, p. 769-777, 2008.

NEWNHAM, R. E. Essentiality of boron for healthy bones and joints. *Environmental Health Perspectives*, v. 102, Suppl 7, p. 83-85, 1994.

NIKITOVOC, D.; ZAFIROPOULOS, A.; TZANAKAKIS, G. N.; KARAMANOS, N. K.; TSATSAKIZ, A. M. Effects of glycosaminoglycans on cell proliferation of normal osteoblasts and human osteosarcoma cells depend on their type and fine chemical compositions. *Anticancer Research*, v. 25, n. 4, p. 2851–2856, 2005.

OLIVEIRA, J.; HYPPOLITO, M. A.; NETTO J. C.; MRUÉ, F. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. *Rev. Bras. Otorrinolaringol*, v. 69, n. 5, p. 649-655, 2003.

OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, R.; CESTARI, T. M.; TAGA, E. M.; TAGA R.; BUZALAF M. A. R. et al. Tissue response to a membrane of desmineralized bovine cortical bone implanted in the subcutaneous tissue of rats. *Brazilian Dental Journal*, v. 15, n. 1, p. 3-8, 2004.

OLIVEIRA, R. B.; SILVEIRA, R. L.; MACHADO, R. A. Uso do enxerto desmineralizado homogêneo em alvéolo pós-extração: Relato de casos. *Revista de Cirurgia Traumatologia Buco-Maxilo-Facial*, v. 5, n. 4, p. 31-36, 2005.

PEARCE, A.; RICHARDS, R. G.; MILZ, S.; SCHNEIDER, E.; PEARCE, S. G. Animal models for implant biomaterial researching bone. *European Cells and Materials Journal*, v. 13, p. 1-10, 2007.

PARK, Y.J. Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate-chitosan sponge for guided bone regeneration. *Journal of Controlled Release*, v. 67, n. 2/3, p. 385-394, 2000.

PINHEIRO, T. C.; SANTOS, F. F. C.; SHIRANE, H. Y.; CUNHA, M. R. Implantes de hidroxiapatita em falhas ósseas produzidas no fêmur de ratos submetidos ao tabagismo passivo. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 43, n. 10, p. 433-441, 2008.

PITTENGER, M. F. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods in Molecular Biology*, v. 449, n. 1, p. 27–44, 2008.

PRINCE, C. W.; NAVIA, J. M. Glycosaminoglycan alterations in rat bone due to growth and fluorosis. *Journal of Nutrition*, v. 113, n. 8, p. 1576-1582, 1983.

RICHARDS, R. G.; MILZ, S.; SCHNEIDER, E.; PEARCE, A. I.; PEARCE, S. G. Animal models for implant biomaterial research. *Cells and Materials*, v. 2, n. 13, p. 1-10, 2007.

RIGO, E. C. S.; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. *Revista Dental Press Periodontia Implantodontia*, v. 1, n. 3, p. 39-50, 2007.

ROSA, A. L.; BELOTI, M. M.; NOORT, R. V.; HATTON, P. V.; DEVLIN, A. J. Surface topography of hydroxyapatite affects ROS17/2.8 cells response. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, v. 16, n. 3, p. 209-215, 2002.

ROTHAMEL, D.; SCHWARZ, F.; SCULEAN, A.; HERTEN, M.; SCHERBAUM, W.; BECKER, J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblastlike cells. *Clinical Oral Implants Research*, v. 15, n. 4, p. 443-449, 2004.

ROTHAMEL, D.; SCHAWSZ, F.; SAGER, M.; HERTEN, M.; SCULEAN, A.; BECKER, J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clinical Oral Implants Research*, v. 16, n. 3, p. 369-378, 2005.

SALBACH, J.; RACHNER, T. D.; RAUNER, M.; HEMPEL, U.; ANDEREGG, U.; FRANZ, S. et al. Regenerative potential of glycosaminoglycans for skin and bone. *Journal of Molecular Medicine*, v. 90, n. 6, p. 625-635, 2012.

SARZI, P. P.; CAMMINO, M. A.; SCARPA, R.; CAPORALI, R.; PARAZZINI, F.; ZANINELLI, A. et al. Osteoarthritis: An overview of the disease and its treatment strategies. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2005.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O.; MILAM, S. B. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 57, n. 9, p. 1122-1126, 1999.

SCHWARZ, F.; ROTHAMEL, D.; HERTEN, M.; SAGER, M.; BECKER, J. Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: an immunohistochemical study in the rat. *Clinical Oral Implants Research*, v. 17, n. 4, p. 403-409, 2006.

_____. Bone regeneration in dehiscence-type defects at chemically modified (SLActives) and conventional SLA titanium implants. A pilot study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 34, n. 1, p. 78-86, 2007a.

_____. Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLAs titanium implants. Preliminary results of a pilot study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*, v. 18, n. 4, p. 481-488, 2007b.

SCHWARZ, F.; ROTHAMEL, D.; HERTEN, M.; WÜSTEFELD, M.; SAGER, M.; BECKER, J. Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*, v. 19, n. 4, p. 402-415, 2008.

SEGUNDO, T. K. Avaliação dos enxertos ósseos e homólogos utilizados em implantodontia. *Revista Gaúcha de Odontologia*, v. 48, n. 4, p. 217-220, 2000.

SELA, M. N.; KOHAVI, D.; KRAUSZ, E.; STEINBERG, D.; ROSEN, G. Enzymatic degradation of collagen- guided tissue regeneration membranes by periodontal bacteria. *Clinical Oral Implants Research*, v. 14, n. 3, p. 263-268, 2003.

SHIGEISHI, H.; TAKECHI, M.; TAKAMOTO, M.; MINAMI, M.; OHTA, K.; KAMATA, N. Clinical evaluation of novel interconnected hydroxyapatite ceramics (IP-CHA) in a maxillary floor augmentation procedure. *Dental Materials Journal*, v. 31, n. 1, p. 54-60, 2012.

STANLEY, M.; AMARAL, J. Colocação imediata de implantes na zona anterior. *Clinical Dentistry*, v. 6, n. 49, p. 22-25, 2009.

STENTZ, W. C.; MEALEY, B., NUMMIKOSKI, P. V.; GUNSOLLEY, J. C.; WALDROP, T. C. Effects of guided bone regeneration around commercially pure titanium and hydroxyapatite-coated dental implants. I. Radiographic Analysis. *Journal of Periodontology*, v. 68, n. 10, p. 199-208, 1997a.

_____. Effects of guided bone regeneration around commercially pure titanium and hydroxyapatite-coated dental implants. II. Radiographic Analysis. *Journal of Periodontology*, v. 68, n. 10, p. 933-949, 1997b.

SUMMERS, M. N.; HALEY, W. E.; REVEILLE J. D.; ALARCON, G. S. Radiographic assessment and psychologic variables as predictors of pain and functional impairment in osteoarthritis of the knee or hip. *Arthritis and Rheumatism*, v. 31, n. 2, p. 204-209, 1988.

TEN CATE, R. Osso. In: *Histologia Bucal: Desenvolvimento, estrutura e função*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, Cap. 7, p. 101-122.

TRITTEN, C. B.; BRAGGER, U.; FOURMOUSIS, I. Guided bone regeneration around an immediate transmucosal implant for single tooth replacement: A case report. *Practical Periodontics Aesthetic Dentistry*, v. 7, n. 1, p. 29-38, 1995.

TROMBELLI, L.; SIMONELLI, A.; PRAMSTRALLER, M.; WIKESJO, U. M. E.; FARINA, R. Single flap approach with and without guided tissue regeneration and a hydroxyapatite biomaterial in the management of intraosseous periodontal defects. *Journal of Periodontology*, v. 81, n. 9, p. 1256, 2010.

WALTER, R. M.; URIU-HARE, J. Y.; OLIN, K. L.; OSTER, M. H.; ANAWALT, B. D.; CRITCHFIELD, J. W. Copper, zinc, manganese, and magnesium status and complications of diabetes *mellitus*. *Diabetes Care*, v. 14, n. 11, p. 1050-1056, 1991.

WEIGEL, J. P. Enxerto Ósseo. In: Mecanismos da moléstia na cirurgia de pequenos animais. 2 ed. São Paulo: Manole, 1996, Cap. 98, p. 791-798.

WI, C. A Systematic review on the management of osseous defects during dental implant placement. *The Annals of Dentistry of the University of Malaya*, Kuala Lumpur, v. 16, n. 1, p. 24-30, 2009.

WU, J.; BAI, Y.X.; WANG, B. K. Biomechanical and histomorphometric characterizations of osseointegration during mini-screw healing in rabbit tibiae. *The Angle Orthodontist*, v. 79, n. 3, p. 558-563, 2009.

VAN DER HARST, M R.; BRAMA, P. A.; VAN DE LEST, C. H.; KIERS, G. H.; DEGROOT, J.; VAN WEEREN, P.R. An integral biochemical analysis of the main constituents of articular cartilage, subchondral and trabecular bone. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 12, n. 9, p. 752-761, 2004.

VAUGHAN-SCOTT, T.; TAYLOR, J. H. The pathophysiology and medical management of canine osteoarthritis. *The Journal of the South African Veterinary Association*, v. 68, p. 21-25, 1997.

VIEIRA, N. T.; MELO, E. G.; REZENDE, C. M. F.; GOMES, M. G.; CALDEIRA, F. M. C.; JESUS, M. C. Efeitos dos glicosaminoglicanos e sulfato de condroitina A sobre a cartilagem articular normal e com doença articular degenerativa articular. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 5, p. 1117-1127, 2010.

YAMAGUCHI, M. Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 338, n. 1-2, p. 241-254, 2010.

YAMKA, R. M.; FRIESEN, K. G.; LOWRY, S. R.; COFFMAN, L. Measurement of arthritic and bone serum metabolites in arthritic, non-arthritic, and geriatric dogs fed wellness foods. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, v. 4, n. 3, p. 255-264, 2006.

YEH, H. C.; HSU, K. W. Guided bone regeneration for fenestration defects in dental implants. *Chang Gung Medical Journal*, v. 26, n. 9, 2003.

YOSHIKAWA, H.; TAMAI, N.; MURASE, T.; MYOUI, A. Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface* , v. 6, n. 3, p. 341-348, 2008.

9 Apêndice

Apêndice – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo, em março de 2012 (Parecer CEUA-UPF Nº 002/2012)

	UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
PARECER Nº 002/2012	
<p>A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo, em reunião no dia 12/03/12, analisou o projeto de pesquisa "Uso da Hidroxiapatita associada a Complexo Regenerador Osteoarticular na Formação de Tecido Ósseo em Fenestrações Ósseas Vestibulares de Implantes Dentários", registro na CEUA Nº 014/2011, versão janeiro de 2012, de responsabilidade do pesquisador Vinicius Rosa.</p> <p>Após a análise, a Comissão considerou atendidas as pendências apontadas no parecer CEUA nº 019/2011. Em relação aos aspectos éticos, a Comissão considerou o estudo relevante e com relação custo-benefício adequada. O pesquisador e seus colaboradores estão comprometidos com a observância dos procedimentos para o uso científico de animais estabelecidos na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008 e dos <i>"Princípios Éticos para o Uso de Animais de Laboratório"</i> preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).</p> <p>Diante do exposto, a Comissão, de acordo com suas atribuições definidas na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.</p> <p>O pesquisador deverá apresentar relatório à CEUA ao final do estudo.</p> <p>Situação: PROTOCOLO APROVADO</p> <p style="text-align: right;">Passo Fundo, 12 de março de 2012.</p> <p style="text-align: center;"> Prof. Ana Cristina Vendrametto V. Giacomini Coordenadora – CEUA – UPF</p>	

Artigo submetido ao periódico Clinical Oral Investigation.

Effects of chondro-osseous regenerative compound associated with local treatments in the regeneration of dehiscence defects: an in vivo study.

André Tonetto¹

Pablo Walker Lago¹

Márcia Borba¹

Vinícius Rosa^{2*}

1 University of Passo Fundo, School of Dentistry, Passo Fundo, Brazil.

2 National University of Singapore, Faculty of Dentistry, Singapore.

*Author for correspondence

Vinicius Rosa

National University of Singapore, Faculty of Dentistry, Oral Sciences

11 Lower Kent Ridge

Road, Singapore 119083, Singapore

Tel: +65 6779 5555 ext 1650;

Fax: + 65 6778 5742;

E-mail: denvr@nus.edu.sg

ABSTRACT

Objectives: The objective of this study was to evaluate the use of a chondro-osseous regenerative compound (CORC) with different local treatments for bone regeneration in dehiscence defects. The hypothesis is CORC can enhance bone regeneration with or without local treatment.

Materials and Methods: Twelve dogs received four implants each in the right femur. Bony defects (4 mm height x 4 mm width) were created and treated as follow: reabsorbable membrane (Mem); hydroxyapatite (HA); hydroxyapatite covered with membrane (HA+Mem) or left untreated (Con). Six dogs received one pill of the CORC daily. After 90 days, the height of bone formation, new bone area (NBA) and bone to implant contact (BIC) within the threads were measured. Results were statistically analyzed using ANOVA and Tukey's test with 5% significance level.

Results: CORC did not increase any of the parameters evaluated. HA+Mem presented with higher height of bone formation as compared to Con and Mem, but statistically similar to HA alone. There were no difference for NBA among the local treatments however HA and HA+Mem presented higher BIC values than Con.

Conclusions: The hypothesis was rejected since the use of CORC has not increased any of the parameters evaluated. HA, with or without the use of Mem, had increased the bone height formation and BIC.

Clinical Relevance: Dehiscence-like defects can compromise soft tissue support and result in loss of periodontal health and implants.

Hydroxyapatite can induce bone regeneration in the defects created. CORC in the formulation used in this study did not promote further bone regeneration in dehiscence-like defects.

INTRODUCTION

Insufficient buccal alveolar bone volume may result in fenestration or dehiscence-like defects around implants that compromise the soft tissue support, resulting in poor esthetics, loss of periodontal health and pain. Furthermore, the early exposure of implant threads combined with bacterial contamination, increasing the risk of failure.

Machining of titanium can create rough surface that may compromise the access for cleaning [1]. When threads are exposed, their rough surface allow bacterial colonization leading to peri-implantitis, an infection of the surrounding bone with an overall frequency reported to be as high as 8%. This condition can lead to bone loss, less anchorage of the implant, decreased stability of the reconstruction and possibly the need to remove the implant surgically [2,3].

To heal these defects, guided bone regeneration (GBR) is frequently used. GBR involves the use of a physical barrier, such as membranes, to keep and protect the blood clot, avoiding soft tissue invasion into the wound area [4]. Membranes can be non-resorbable (*e.g.* expanded polytetrafluorethylene – ePTFE) or resorbable (*e.g.* type I and III collagen). Collagen membranes are semi-permeable and present chemotactic properties that facilitate nutrient diffusion and provide early wound stabilization [5]. However, its biodegradation may result in

membrane collapse leading to the invasion of connective tissue into the defect before complete bone regeneration is achieved [6].

Another approach includes filling of defects with biomaterials that provide a tri-dimensional environment, which allows and supports cell migration and differentiation. These phenomena, allied to concomitant angiogenesis, lead to new bone formation during repair. Hydroxyapatite is the biomaterial of choice due to its high tissue compatibility and osteoconductivity [7,8]. Bone formation can be observed directly onto the hydroxyapatite surface without fibrous tissue interposition. Radiological evaluation during clinical investigations of implanted hydroxyapatite and β -TCP in humans revealed satisfactory osteoconductive qualities for both materials [8,9]. Commercially available version of hydroxyapatite are able to induce bone repair in clinical settings [10,7].

Bone remodeling and repair is affected by diverse biological factors such as methionine. It reduces bone loss during osteoporosis via downregulation of TLR4/MyD88/NF- κ B pathway, that is essential for osteoclast development [11]. Likewise, chondroitin sulfate (CS) is a major component of proteoglycans of the extracellular matrix (ECM) of many connective tissues, including cartilage, bone, skin, ligaments and tendons. CS is a sulfated glycosaminoglycan (GAG) and it is the major GAG of human bone tissue (67 to 97% of total amount) [12]. GAGs participate in the regulation of several cellular events, including cell proliferation, adhesion and migration and affect cell growth of normal cells of the osteoblastic lineage in a concentration-dependent manner [13]. While mesenchymal stem cells are differentiating into osteoblast-like cells, the shift from the proliferative

into the differentiation stage is characterized by high synthesis of organic bone matrix including GAGs and proteoglycans [14,15]. Furthermore, the natural over-sulfated chondroitin E has positive effects on collagen deposition, tissue nonspecific alkaline phosphatase activity and mineral accumulation of osteoblasts [16].

The objective of this study was to evaluate the effect of a methionine- and CS-based chondro-osseous regenerative compound (CORC) associated with different local treatments (hydroxyapatite and collagen membrane) in the regeneration of implant dehiscence defects, using an animal model. The tested hypothesis was that the use of the CORC improves the quantity of bone formed into the dehiscence-like defects.

MATERIAL AND METHODS

The study was previously approved by the Animal Ethics Committee (CEUA-UPF No 002/2012) and followed the ARRIVE guidelines. Twelve female dogs (age 20–24 months, weight 14.9±1.9 kg) were sedated (0.17 mg/kg acepromazine, Vetranquil 1%, Ceva, Germany) and anesthetized by intravenous injection of 21.5 mg/kg thiopental-sodium (Trapanal 2.5%, Altana GmbH, Germany). Four implant beds, 1.3 cm apart, were prepared in the right leg femur according to the implant manufacturer's protocol (DSP Biomedical, Brazil). After drilling, a dehiscence-like defect (4 mm height x 4 mm width) was created by removing the external portion of the cortical bone using a trephine bur (TRE040M, Hu-Friedy, USA) and implants (intern hexagon, 3.3 mm diameter and 10 mm height) were placed in the

sockets. Primary stability was achieved in all implants and the height of the dehiscence checked using periodontal probes.

Each dehiscence defect was randomly treated with:

Hydroxyapatite (HA): synthetic resorbable calcium hydroxyapatite (Osteogen, Intra-Lock, Brazil) was mixed with saline solution and applied on the defects

Membrane (Mem): defects were covered with a resorbable lyophilized bovine bone collagen membrane (Gen Derm, Genius Baumer, Brazil)

Hydroxyapatite + Membrane (HA+Mem): defects were filled with HA and, subsequently, covered with Mem

Control (Con): defects were left untreated (blood clot only).

After, the soft tissues were repositioned and sutured. Postoperatively, the dogs received analgesics (intramuscularly 4 mg/kg of Tramadol; Grünenthal GmbH, Aachen, Germany) for one week and antibiotics (25 mg/kg of cefalexin subcutaneously) for three days. Additionally, a pill of a CORC designed for dogs (Table 1) was administered daily for 90 days to six animals randomly selected.

After 90 days, the surgical site was reopened and the defect size (vertical distance from the implant platform to the bone tissue) was measure with a periodontal probe. Then, the implants were retrieved using a trephine bur (TRE80M, Hu-Friedy, USA). Titanium plates and screws were placed to minimize the chances of femur fracture due to the presence of hollow spaces. No fractures or animal death were observed after 90 days from this procedure. Specimens were fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 hours, dehydrated and infiltrated with acrylic resin (Technovit 7200s, VLC-Heraeus Kulzer GmbH,

Germany). Samples were cut to 150 µm thickness sections (EXAKT 400CS, Exakt, Germany), polished to 35-50 µm (800-2400 grit, EXAKT micro-grinding system) and 0.3 µm alumina polishing paste. The second slide obtained was stained with eosin and hematoxylin and the third with Stevenel's blue. First and fourth slides were discarded.

Images were acquired and the following parameters were evaluated for each local treatment: a) New Bone Area (NBA): area of the newly formed bone within the thread; b) Bone to Implant Contact (BIC): length of implant surface in contact with newly formed bone within the threads; c) Effective bone contact (EBC): the percentage of the thread in contact with bone as a function of the newly formed bone. Data was obtained by analyzing separately each one of the four first implant threads (being 1 the closest and 3 the furthest to the implant platform) using an image processing software (Image J, NIH, USA). Data was statistically analyzed using two-way ANOVA and Tukey's Post Hoc Test at a pre-set significance level of 5%.

RESULTS

There was no statistical significance for the CORC factor and for the interaction between factors (CORC and local treatment, $p > 0.05$) for the vertical height, NBA and BIC. Fig. 1 present the histological characteristics of tissue formed for all experimental groups.

There was a significant difference for the local treatment for all parameters. Considering the clinical height of bone formation, groups HA+Mem and HA presented higher value measured prior to the implant removal in comparison to Mem group ($p = 0.0004$). No significant difference was observed among Con and Men groups (Table 2).

The bone formed inside each implant thread is shown in Fig. 2. There were no statistical differences for NBA (Fig. 3) neither when the threads were analyzed within each group nor across the groups studied ($p>0.05$).

When BIC value was calculated considering all threads, groups HA and HA+Mem presented higher BIC values when compared to Con (Table 3). However, when threads were analyzed separately, there was no statistical difference for BIC values within the same group or for a given thread within different groups (Fig. 4).

Table 4 presents the percentage of thread surface in contact with bone as a function of NBA. In average, HA+Mem and HA presented 30 and 40% more NBA in contact with the implant as compared to Con.

DISCUSSION

CORC had no effect on the bone formation, rejecting the study hypothesis. The absence of a positive effect when the CORC was used may be explained by the critical role of CS sulfation on bone mineralization. The elevation of native CS-containing proteoglycans interferes with mineralization. Precoating hydroxyapatite crystals with proteoglycan aggregates decreased the amount of hydroxyapatite precipitated as a function of time *in vitro*. Furthermore, proteoglycans may block the active nucleating sites and slow down the hydroxyapatite growth process [17]. In human subchondral bone osteoblasts, CS upregulates osteoprotegerin (OPG) expression while decreasing RANKL expression. OPG can reduce the production of osteoclasts by inhibiting the differentiation of osteoclast precursors (such as monocytes and

macrophages) [18]. CS may bind calcium ions acting as a starting point for mineralization [19] however, animals suffering from mucopolysaccharidosis, where CS accumulates, show severe destructive joint and bone disorders [20].

In addition, a study showed that the excess dietary methionine does not affect bone healing in mice. Animals who have been fed with methionine-enriched diet showed no significant differences in size and composition of the callus when compared to those receiving normal diet [21]. Due to the lack of positive effects on the amount of bone formed, it seems that the use of this CORC formulation containing chondroitin sulfate A is not advised to improve bone regeneration of dehiscence defects.

Another factor that could contribute for the absence CORC effect on bone regeneration was the evaluation period of 90 days. As mesenchymal stem cells (MSCs) are highly abundant in cavities of long bones such as the femur [22] it is possible that during the timeframe MSCs could migrate, differentiate and repair the defects in levels comparable to the group that received CORC. Further studies with an earlier evaluation point should be performed to confirm this proposition.

The sub-mucosal debridement alone, performed by utilizing either carbon fiber curettes or ultrasonic device, may be not sufficient to decontaminate the surfaces of implants with peri-implant pockets equal or higher than 5 mm depth and exposed implant threads [23]. In the present study, the height of bone regeneration observed when using either HA with or without Mem was able to cover all the exposed threads.

One of the critical factors for successful GBR is space maintenance [24]. Although after 12 weeks no wound dehiscence and membrane exposure were observed, which could result in extensive loss of soft tissues and the failure of regeneration, the use of a collagen membrane alone has not improved neither the bone regeneration height nor BIC/thread as compared to the control (Table 2 and 3).

There is lack of consensus in the literature regarding the benefits of using membrane alone to promote further bone healing in dehisces [25-28]. There are three major reasons for that: a) membrane collapse leading to compression of clot against the implant surface [26]; b) decompensation between the bone formation and collagen membrane resorption rates allowing connective tissue invasion to the defects [4] and; c) membrane displacement or exposure during the healing phase [25]. The latter is related to sites with poorer bone regeneration [28,26]. Here, no membrane exposures were observed during the evaluation period. One possible reason for that is that resorbable membranes are less susceptible to complications as compared to non-resorbable ones [29].

The membrane was used combined with hydroxyapatite in order to prevent the fibrous tissue in-growth into the porous structure of the hydroxyapatite used. Previously, the use of a barrier membrane on β -tricalcium phosphate and type I collagen cones has been shown to reduce the horizontal and vertical bone loss of the alveolar ridges in humans [30]. However, both the histological characteristics and histomorphometric parameters evaluated showed no improvements in the quantity nor the quality of the tissues formed for HA+Mem comparing to HA alone. One possible reason may be related to the

ability of the hydroxyapatite to act as a bulk material after wetting, being capable to preserve its three-dimensional shape and avoid soft tissue invasion by itself. Although HA and HA+Mem presented higher vertical regeneration, the amount of bone area formed within every thread was fairly the same for all the groups and threads studied (Fig. 2 and 3). From the perspective of thread covering, the strategies employing either membranes and/or hydroxyapatite were able to cover effectively all the threads once exposed. Of note, in some cases for HA and HA+Mem the vertical regeneration exceeded the height of the defect site growing over the top of the implant (Fig. 1).

Effective bone-to-implant contact, is the key for implant treatment success [31]. Coating implants with fine particles of hydroxyapatite and collagen type I in solution was able to improve both the peri-implant bone formation and BIC as compared to hydroxyapatite alone in rabbits after an evaluation period of 6 weeks [32]. Although the NBA within the threads was similar for all the groups tested, HA and HA+Mem presented significantly higher BIC mean values as compared to Con (Table 3). Even though the BIC obtained for HA+Mem in thread 1 was 67% higher than Con, the high standard deviation of HA was responsible for hindering the statistical significance.

Overall, HA and HA+Mem enhanced 23 and 28% the proportion of BIC as a function of the area of new bone formed as compared to Con. Considering the thread 1 alone, the improvements obtained for HA+Mem and HA were 68 and 87% higher as compared to Con, respectively. These strategies provide one environment that not only stimulate bone growth but lead to a situation where the bone formed is effectively in contact with the implant surface.

CONCLUSION

The daily systemic administration of CORC was not able to improve any of the parameters evaluated. Treating the defects with hydroxyapatite, alone or combined with membrane, resulted in higher vertical height and BIC.

DECLARATION OF INTEREST

The authors were supported by grants from the National University of Singapore (R-221-000-061-133, VR). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

REFERENCES

1. Schou S, Berglundh T, Lang NP (2004) Surgical treatment of peri-implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 19 Suppl:140-149
2. el Askary AS, Meffert RM, Griffin T (1999) Why do dental implants fail? Part I. *Implant Dent* 8 (2):173-185
3. Pesskova V, Kubies D, Hulejova H, Himmlova L (2007) The influence of implant surface properties on cell adhesion and proliferation. *J Mater Sci Mater Med* 18 (3):465-473. doi:10.1007/s10856-007-2006-0
4. Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Wustefeld M, Sager M, Ferrari D, Becker J (2008) Immunohistochemical characterization of

guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 19 (4):402-415. doi:10.1111/j.1600-0501.2007.01486.x

5. Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH (1978) Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (2):871-875

6. Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Hertel M, Sculean A, Becker J (2005) Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 16 (3):369-378. doi:10.1111/j.1600-0501.2005.01108.x

7. Jang CH, Cho YB, Choi CH, Jang YS, Jung WK, Lee JK (2014) Comparison of osteoconductivity of biologic and artificial synthetic hydroxyapatite in experimental mastoid obliteration. *Acta Otolaryngol* 134 (3):255-259. doi:10.3109/00016489.2013.859397

8. LeGeros RZ (2002) Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* (395):81-98

9. LeGeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, Mijares D, LeGeros JP (2003) Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med* 14 (3):201-209

10. Ogose A, Kondo N, Umezumi H, Hotta T, Kawashima H, Tokunaga K, Ito T, Kudo N, Hoshino M, Gu W, Endo N (2006) Histological assessment in grafts of highly purified beta-tricalcium phosphate (OSferion) in human bones. *Biomaterials* 27 (8):1542-1549. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.08.034

11. Vijayan V, Khandelwal M, Manghani K, Gupta S, Suroliya A (2014) Methionine down-regulates TLR4/MyD88/NF-kappaB signalling in osteoclast precursors to reduce bone loss during osteoporosis. *Br J Pharmacol* 171 (1):107-121. doi:10.1111/bph.12434

12. Mania VM, Kallivokas AG, Malavaki C, Asimakopoulou AP, Kanakis J, Theocharis AD, Klironomos G, Gatzounis G, Mouzaki A, Panagiotopoulos E, Karamanos NK (2009) A comparative biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in human orthotopic and heterotopic bone. *IUBMB Life* 61 (4):447-452. doi:10.1002/iub.167

13. Nikitovic D, Zafiroopoulos A, Tzanakakis GN, Karamanos NK, Tsatsakis AM (2005) Effects of glycosaminoglycans on cell proliferation of normal osteoblasts and human osteosarcoma cells depend on their type and fine chemical compositions. *Anticancer Res* 25 (4):2851-2856

14. Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS (2004) Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 14 (1-2):1-41
15. Becker D, Geissler U, Hempel U, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H, Wenzel KW (2002) Proliferation and differentiation of rat calvarial osteoblasts on type I collagen-coated titanium alloy. *J Biomed Mater Res* 59 (3):516-527
16. Miyazaki T, Miyauchi S, Tawada A, Anada T, Matsuzaka S, Suzuki O (2008) Oversulfated chondroitin sulfate-E binds to BMP-4 and enhances osteoblast differentiation. *J Cell Physiol* 217 (3):769-777. doi:10.1002/jcp.21557
17. Chen CC, Boskey AL (1985) Mechanisms of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite growth. *Calcif Tissue Int* 37 (4):395-400
18. Tat SK, Pelletier JP, Verges J, Lajeunesse D, Montell E, Fahmi H, Lavigne M, Martel-Pelletier J (2007) Chondroitin and glucosamine sulfate in combination decrease the pro-resorptive properties of human osteoarthritis subchondral bone osteoblasts: a basic science study. *Arthritis Res Ther* 9 (6):R117. doi:10.1186/ar2325
19. Ruoslahti E, Yamaguchi Y (1991) Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64 (5):867-869
20. Simonaro CM, D'Angelo M, He X, Eliyahu E, Shtraizent N, Haskins ME, Schuchman EH (2008) Mechanism of glycosaminoglycan-mediated bone and joint disease: implications for the mucopolysaccharidoses and other connective tissue diseases. *Am J Pathol* 172 (1):112-122. doi:10.2353/ajpath.2008.070564
21. Holstein JH, Schmalenbach J, Herrmann M, Olku I, Garcia P, Histing T, Herrmann W, Menger MD, Pohlemann T, Claes L (2012) Excess dietary methionine does not affect fracture healing in mice. *Med Sci Monit* 18 (12):BR469-474
22. Augello A, Kurth TB, De Bari C (2010) Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater* 20:121-133
23. Karring ES, Stavropoulos A, Ellegaard B, Karring T (2005) Treatment of peri-implantitis by the Vector system. *Clin Oral Implants Res* 16 (3):288-293. doi:10.1111/j.1600-0501.2005.01141.x
24. Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S (2000) Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol* 2000 24:253-269

25. Palmer RM, Floyd PD, Palmer PJ, Smith BJ, Johansson CB, Albrektsson T (1994) Healing of implant dehiscence defects with and without expanded polytetrafluoroethylene membranes: a controlled clinical and histological study. *Clin Oral Implants Res* 5 (2):98-104
26. Lee JS, Ko SH, Kim YT, Jung UW, Choi SH (2012) Guided bone regeneration using cyanoacrylate-combined calcium phosphate in a dehiscence defect: a histologic study in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 70 (9):2070-2079. doi:10.1016/j.joms.2012.04.044
27. Stentz WC, Mealey BL, Nummikoski PV, Gunsolley JC, Waldrop TC (1997) Effects of guided bone regeneration around commercially pure titanium and hydroxyapatite-coated dental implants. I. Radiographic analysis. *J Periodontol* 68 (3):199-208. doi:10.1902/jop.1997.68.3.199
28. Oh TJ, Meraw SJ, Lee EJ, Giannobile WV, Wang HL (2003) Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. *Clin Oral Implants Res* 14 (1):80-90
29. Chiapasco M, Zaniboni M (2009) Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri-implant dehiscences and fenestrations: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 20 Suppl 4:113-123. doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01781.x
30. Brkovic BM, Prasad HS, Rohrer MD, Konandreas G, Agrogiannis G, Antunovic D, Sandor GK (2012) Beta-tricalcium phosphate/type I collagen cones with or without a barrier membrane in human extraction socket healing: clinical, histologic, histomorphometric, and immunohistochemical evaluation. *Clin Oral Investig* 16 (2):581-590. doi:10.1007/s00784-011-0531-1
31. Davies JE (1998) Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 11 (5):391-401
32. Lee SW, Hahn BD, Kang TY, Lee MJ, Choi JY, Kim MK, Kim SG (2014) Hydroxyapatite and collagen combination-coated dental implants display better bone formation in the peri-implant area than the same combination plus bone morphogenetic protein-2-coated implants, hydroxyapatite only coated implants, and uncoated implants. *J Oral Maxillofac Surg* 72 (1):53-60. doi:10.1016/j.joms.2013.08.031

Table 1 Chondro-osseous regenerative compound composition (mg per pill)

Chondroitin sulfate A	20.87	2	Zn gluconate	6.91	1
Methionine	2.20	5	Mg gluconate	0.46	1
Cystine	.35	8	Mn gluconate	0.46	1
Betaine	.18	4	Cu glycinate	.46	1
Histidine	.18	4	Na selenite	.005	C
Vitamin B6	.35	8	Excipient	.000	1
Vitamin E	.26	6	q.s.p.		

Table 2 Vertical height of the newly formed bone (mm). Similar capital letters in the column and small letters in the row are statistically similar ($p>0.05$)

	Control	Mem	HA+	HA+
			A	Mem
Wit	2.3	2.	3.	3.1 ±
h CORC	± 0.5 ^{Aab}	1 ± 0.3 ^{Ab}	0 ± 0.6 ^{Aa}	0.6 ^{Aa}
Wit	2.5	2.	3.	3.2 ±
hout CORC	± 0.0 ^{Aab}	3 ± 0.8 ^{Ab}	0 ± 0.5 ^{Aa}	0.6 ^{Aa}

Table 3 Mean of BIC (μm) *per* thread for the groups tested (Data for with and without CORC were combined, different letters indicate statistically significant difference)

Cont rol	Mem	HA	HA+ Mem
175.0 $\pm 102.4^b$	206. 7 ± 102.1^{ab}	275. 3 ± 118.4^a	269.4 $\pm 93.6^a$

Table 4 Percentage of BIC as a function of NBA (%/mm)

Group	Thread 1	Thread 2	Thread 3	Thread 4	Mea
Control	29.5	47.4	53.4	52.2	5.6
Mem	48.3	44.7	53.7	74.6	5.3
HA	55.4	50.3	66.1	84.6	4.1
HA+Mem	47.2	69.2	53.9	67.4	9.4

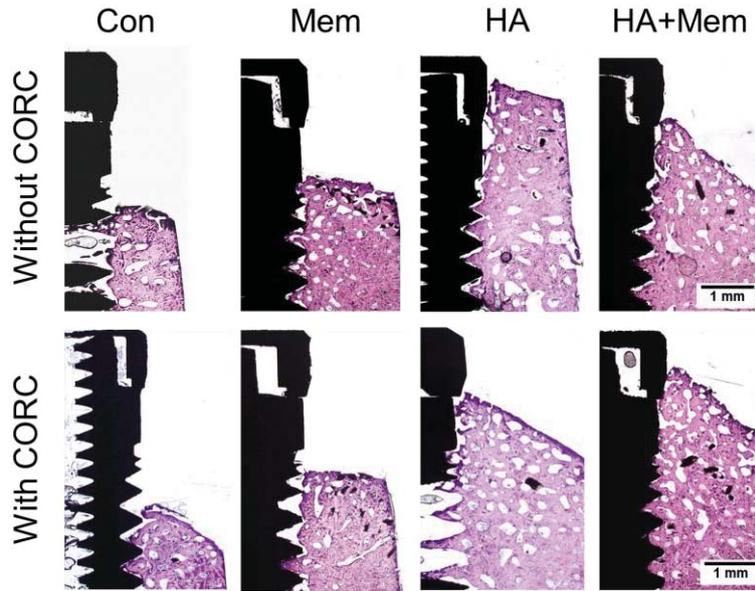


Fig 1 Representative histological views of wound healing for all the groups tested (Hematoxylin and eosin)

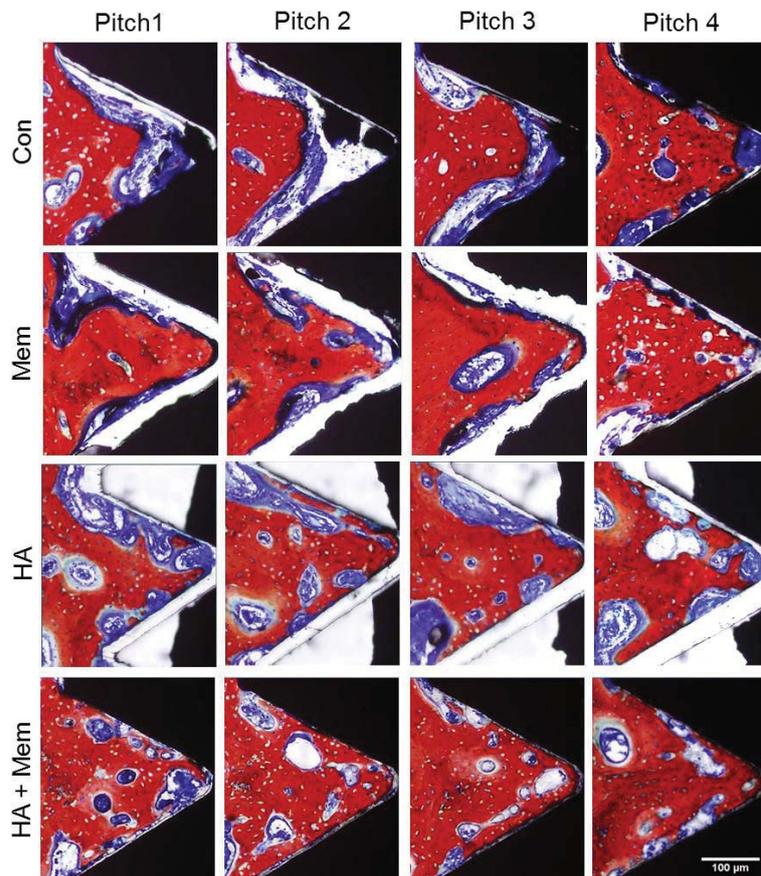


Fig 2 Representative histological views of NBA and BIC for different local treatments. Data for CORC and without CORC were combined as no significant difference was observed for the use of CORC. (Stevenel's blue staining, red: newly formed bone; blue: connective tissue)

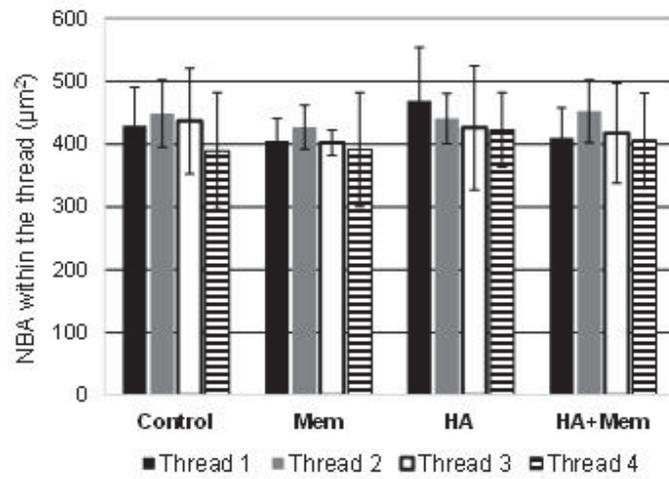


Fig 3 NBA for different local treatments the use of CORC. No statistical was observed when the threads were analyzed within each group nor across the groups studied ($p>0.05$)

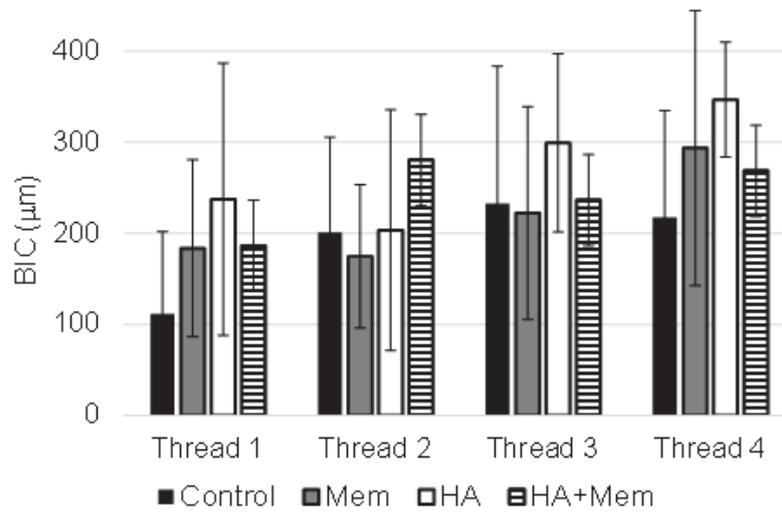


Fig 4 Bone to implant contact for all the local treatments. Data for with and without CORC were combined. No statistical difference for BIC values within the same group or for the same thread within different groups