

MARCO ANTÔNIO BRANDÃO PONTUAL

**ESTUDO COMPARATIVO DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA ENTRE PARAFUSO DE
OSSO CORTICAL BOVINO E ENXERTO ÓSSEO APOSICIONAL**

Florianópolis-SC
Março, 2006

MARCO ANTÔNIO BRANDÃO PONTUAL

**ESTUDO COMPARATIVO DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA ENTRE PARAFUSO DE
OSSO CORTICAL BOVINO E ENXERTO ÓSSEO APOSICIONAL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção de título de Doutora em Odontologia - Área de Concentração em Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

Florianópolis - SC
Março, 2006

MARCO ANTÔNIO BRANDÃO PONTUAL

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de “Doutor em Odontologia”, área de concentração Implantodontia, e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 9 de março de 2006.

Prof. Dr. Ricardo de Souza Vieira
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Orientador

Prof. Dr. Eloir Passanesi
Membro

Prof. Dr. Ariel Lenharo
Membro

Prof. Dr. André Alberto Câmara Puppim
Membro

Profa. Dra. Fernanda Boabaid
Membro

Dedico este trabalho:

A cada pessoa que se entrega à nobre arte do ensino, seja ele fundamental, médio ou superior, pois somos todos heróis sem o merecido reconhecimento das autoridades constituídas, seja no apoio às pesquisas; nas bolsas escolares para nossos alunos ou para nosso próprio aperfeiçoamento profissional; na remuneração digna ou no material básico que cada docente necessita para exercer a sua profissão com competência e prazer. Ser professor neste nosso país é, antes de qualquer coisa, ser um idealista de querer um país melhor para nossos filhos.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que, apesar de minha pouca fé, tem sido misericordioso e de infinita bondade em me auxiliar no enfrentamento dos desafios desta vida.

À minha **Giselle**, anjo que Deus me enviou para fazer a minha felicidade e para que eu possa amar e honrar até o fim dos meus dias aqui na terra.

Aos meus filhos: **Mariana, Marco Antônio, Alexandre Augusto e João Pedro**. São bênçãos divinas que recebi para ter sempre a esperança de um mundo melhor.

Deus levou para si a minha mãe, **Marly**, muito cedo, mas recompensou-me enviando muitas outras “mães” a quem nunca vou poder expressar o tamanho do meu amor e gratidão: **Luizita, Therezinha, Darlene, Zarinha, Louis e Ana**. Tenho um pouco de cada uma de vocês dentro do meu coração, e isto me faz uma pessoa melhor e mais amorosa .

Ao meu **pai**, que dentro da sua pouca compreensão do que eu sempre quis para minha vida, acertou sua previsão repetida desde que eu era muito jovem, que “este menino só tem tamanho”. Fiquei “grande” pai, talvez bem maior do que o senhor esperava.

Aos meus irmãos: **Jorge Luiz, Maria do Rosário e Maria Cecília**, pelo constante incentivo.

À minha sogra **Maria Rita, Caluca, Verinha, Belinha, Sílvia, Roberto e família** pela amizade, amor e carinho que sempre demonstraram por mim.

Não existe vitória sem equipe, e fui abençoado quando encontrei a “família” chamada **CEPID**, aonde as pessoas sempre me receberam de braços abertos e, quase sempre, riram de minhas horríveis piadas. Minha gratidão a cada funcionário e colega de pós-graduação com os quais convivi num paraíso chamado Florianópolis.

A todas as pessoas que trabalham na **Clínica de Reabilitação Oral**, que sabem me compreender, alegrar-se comigo e me apoiar sempre.

À Universidade Federal de Santa Catarina, por ter me proporcionado esta oportunidade. Em especial ao **Prof. Dr. Ricardo de Souza Vieira** e **Prof. Dr. Sérgio Torres de**

Freitas, que fazem o nome da Universidade Federal de Santa Catarina brilhar onde eles estiverem.

As pessoas que conheci trabalhando no CEPID (**Rose, Dolores, Gisella e Mirian**) pela consideração que sempre tiveram por mim.

Nos momentos de alegria, e também de angústia, Deus manda pessoas trazerem a sua luz para que eu não me sinta só. Muito obrigado meu AMIGO **Bianchini, Octávio, Dircilene, Nilo, Cimara, Alberto Zortéa, Moira, Gustavo, Kavio, Magalhães, Leonardo (China)** e outros que foram “se achegando” com o passar dos anos.

Agradeço aos colegas **professores do Departamento de Prótese Dentária do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo**, pelo suporte dado aos senhores alunos durante a minha ausência para cursar este Doutorado.

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Cardoso**, o qual creio ter sido o guia usado por Deus para mostrar-me este caminho e para dar-me exemplos como docente que jamais esquecerei.

PONTUAL, Marco Antônio Brandão. **Estudo comparativo da neoformação óssea entre parafuso de osso cortical bovino e enxerto ósseo aposicional.** 2006, 71f. Tese (Doutorado em Odontologia, área de concentração Implantodontia) – Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar o uso de parafuso de osso cortical bovino (POCB) com o enxerto ósseo autógeno aposicional (EOAA). Portanto, 18 cães Beagle fêmeas receberam 4 POCB e 1 EOAA. Os marcadores fluorocromáticos utilizados foram, alisarina, calceína e tetraciclina. Secções de amostras dos dois grupos foram analisadas por meio da microscopia de fluorescência após 2, 4, e 6 meses pós-operatórios. Os resultados mostram presença de osso neoformado nos dois grupos analisados. O POCB foi gradativamente substituído por osso neoformado após integrar-se ao sítio receptor, indicando propriedade osseointegradora e osseointegradora. Adicionalmente, o osso estava contínuo com o sítio receptor. O EOAA também mostrou propriedades osseointegradora e osseointegradoras. No entanto, a velocidade de deposição óssea foi menor em comparação com a velocidade de degradação do EOAA. Nos intervalos de análise, o POCB mostrou formação óssea estatisticamente significativa comparado com o EOAA. Conclui-se que o POCB apresenta menor absorção óssea comparado com o EOAA. Sugere-se o uso do POCB como alternativa quando EOAA é indicada, devido à alta absorção do EOAA no sítio cirúrgico.

Palavras-chave: Parafuso de osso cortical bovino, Enxerto de osso autógeno aposicional, Regeneração óssea.

PONTUAL, Marco Antônio Brandão. **Estudo comparativo da neoformação óssea entre parafuso de osso cortical bovino e enxerto ósseo aposicional.** 2006, 71f. Tese (Doutorado em Odontologia, área de concentração Implantodontia) – Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the use of bovine cortical bone screw (BCBS) with autogenous onlay bone graft (AOBG). Therefore, 18 female Beagle dogs received 4 BCBS and 1 AOBG. The fluorchromatic markers used were, alisarine, calceïne and tetracycline. Sections of samples obtained from both techniques were analysed by fluorescence microscopy after 2, 4, and 6 months. Results showed newly formed bone in both groups. The BCBS was gradationally substituted by bone after integrated in the receptor site, indicating an osteoinductive and osteoconductive property. The AOBG was gradationally substituted by bone after integrated in the receptor site. However, the bone formation was slower, compared to bone AOBG degradation. The BCBS showed statistically significant newly formed bone compared to AOBG in all time intervals. The authors concluded that BCBS presented less bone absorption compared to AOBG. The use of BCBS can be suggested as an alternative to AOBG, due to the high bone absorption of the latter in the receptor site.

Key-words: Bovine cortical bone screw, Autogenous bone graft, Bone augmentation.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	9
ARTIGO	11
MANUSCRIPT	43
APÊNDICE 1 – Relação de trabalhos publicados e enviados para publicação durante o doutorado	69

INTRODUÇÃO

A atrofia óssea que ocorre nos desdentados pode estar associada com outros problemas, como: função e estética facial. Muitos destes problemas podem ser eliminados com a instalação de implantes dentários para suportar ou reter uma prótese fixa ou removível.¹

Técnicas de aumento de volume ósseo são utilizadas para viabilizar a instalação de implantes dentários.² O padrão ouro para enxertia óssea é o osso autógeno, o qual pode ser coletado de áreas intra ou extra-bucais. Existem varias técnicas de enxerto ósseo,³⁻¹⁰ no entanto, a regeneração óssea da região posterior da mandíbula pode apresentar um grande desafio para o cirurgião,¹ o qual poderá optar pela aplicação da técnica de deslocamento lateral do nervo alveolar inferior da mandíbula. Esta técnica envolve riscos que podem resultar em efeitos colaterais indesejáveis para o paciente,¹ como sensação de queimação na mandíbula do lado operado, parestesia, hiperestesia e, até mesmo, fratura mandibular.¹⁵⁻²⁰

A distração osteogênica¹¹⁻¹⁴ é uma alternativa para aumento vertical de tecido ósseo, no entanto, é uma técnica mais indicada para a região da pré-maxila apresentando reabsorção severa.¹⁴ Adicionalmente, destacam-se os materiais aloplásticos, como o bio-vidro e a hidroxiapatita. Neste grupo, encontra-se também o osso xenógeno de origem bovina, que se apresenta em forma de bloco ou particulado.

O presente estudo utilizou o osso cortical bovino, formatado em parafuso apresentando uma cabeça em forma de bloco, a qual permite a condução da neoformação óssea.

ARTIGO

Parafuso de osso cortical bovino: uma nova alternativa a enxertos ósseos autógenos aposicionais.

Este artigo está formatado conforme as normas da elaboração de artigos da *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar o uso de parafuso de osso cortical bovino (POCB) com o enxerto ósseo autógeno aposicional (EOAA). Portanto, 18 cães Beagle fêmeas receberam 4 POCB e 1 EOAA. Os marcadores fluorocromáticos utilizados foram, alisarina, calceína e tetraciclina. Secções de amostras dos dois grupos foram analisadas por meio da microscopia de fluorescência aos 2, 4, e 6 meses pós-operatórios. Os resultados mostram presença de osso neoformado nos dois grupos analisados. O POCB foi gradativamente substituído por osso neoformado após integrar-se ao sítio receptor, indicando propriedade osseointegradora e osseointegradora. Adicionalmente, o osso estava contínuo com o sítio receptor. O EOAA também mostrou propriedades osseointegradora e osseointegradoras. No entanto, a velocidade de deposição óssea foi menor em comparação com a velocidade de degradação do EOAA. Nos intervalos de análise, o POCB mostrou formação óssea estatisticamente significativa comparado com o EOAA. Conclui-se que o POCB apresenta menor absorção óssea comparado com o EOAA. Sugere-se o uso do POCB como alternativa quando EOAA é indicada, devido à alta absorção do EOAA no sítio cirúrgico.

Palavras-chave: Parafuso de osso cortical bovino, Enxerto de osso autógeno aposicional, Regeneração óssea.

INTRODUÇÃO

A atrofia óssea que ocorre nos desdentados pode estar associada com outros problemas, como a função e a estética facial. Muitos destes problemas podem ser eliminados com a instalação de implantes dentários para suportar ou reter próteses fixas ou removíveis¹.

Técnicas de aumento de volume ósseo são utilizadas para viabilizar a instalação de implantes dentários². O padrão ouro para enxertia óssea é o osso autógeno, o qual pode ser coletado de áreas intra ou extra-buciais. Existem varias técnicas de enxerto ósseo,³⁻¹⁰ no entanto, a regeneração óssea da região posterior da mandíbula pode apresentar um grande desafio para o cirurgião,¹ o qual poderá optar pela aplicação da técnica de deslocamento lateral do nervo alveolar inferior da mandíbula. Esta técnica envolve riscos que podem resultar em efeitos colaterais indesejáveis para o paciente,¹ como sensação de queimação na mandíbula do lado operado, parestesia, hiperestesia e, até mesmo, fratura mandibular.¹⁵⁻²⁰

A distração osteogênica¹¹⁻¹⁴ é uma alternativa para ganho vertical de tecido ósseo, no entanto, é uma técnica mais indicada para a região da pré-maxila apresentando reabsorção severa.¹⁴ Adicionalmente, destacam-se os materiais aloplásticos, como o bio-vidro e a hidroxiapatita. Neste grupo, encontra-se também o osso xenógeno de origem bovina, que se apresenta em forma de bloco ou particulado.

No presente estudo utilizou-se o osso cortical bovino em forma de parafuso apresentando uma cabeça em forma de bloco para permitir a condução da neoformação óssea.

MATERIAL E METÓDOS

Manufatura dos parafusos de osso cortical bovino

O osso bovino utilizado foi obtido da Baumer SA.*¹. Os animais doadores das estruturas ósseas foram da mesma raça, sexo e idade e derivados do rebanho da própria empresa que os cria com alimentação à base de pasto e ração obtida de fornecedor, cujo credenciamento se baseia na qualidade de carne tipo exportação. O processo de abate, corte e embalagem da carne segue as exigências nacionais da vigilância sanitária e do Ministério da Saúde, os quais estão de acordo com as exigências internacionais. O preparo do parafuso de osso envolveu a coleta e remoção de resíduos musculares, tendões, vasos sanguíneos e linfáticos e gordura. Em seguida sofreram tratamento químico e foram liofilizados. Utilizou-se o osso cortical bovino em bloco (Fig. 1) para a usinagem de 200 parafusos. Foram submetidos a testes de resistência e torção no Laboratório de Usinagem e Comando Numérico (USICON) do Centro Tecnológico do Departamento de Engenharia Mecânica, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Os parafusos foram usinados nas dimensões dos implantes tipo *Osseotite NT MicroMini* (3,25mm x 8,5mm). As dimensões da região da cabeça seguiram as especificações da marca 3i, (3i® – Implant Systems – E.U.A) (4,0mm x 4,0mm), apresentando um comprimento total de 10,0mm, sendo 5,0mm de rosca cônica trapezoidal possuindo diâmetro de 3,0mm e 2,0mm na extremidade livre e passo de 0,8mm; e 5,0mm

*¹ Av. Arnolfo de Azevedo, 210. Pacaembu – 01236-030. São Paulo/SP. Brasil. Fone: (11) 263 8555. E-mail: baumer@baumer.com.br.

de comprimento da cabeça¹⁶(Fig.2). Após a confecção do parafuso de osso cortical bovino, ele foi submetido ao torque manual. A sua resistência ao torque manual indicou ser favorável para a sua aplicação no estudo.

Seleção dos animais

Utilizou-se 18 cães Beagle (*Canis Familiars*) fêmeas jovens, apresentando idade média de 2 anos, obtidos no Biotério Central da UFSC (BC-UFSC). Os cães apresentavam bom estado de saúde geral, estando todos devidamente supervisionados pela equipe do BC-UFSC. A liberação dos animais se deu após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo nº. 244/CEUA.

Procedimentos Cirúrgicos

Primeira Etapa Cirúrgica

Utilizou-se a tíbia dos cães (Fig. 3) como área receptora. O procedimento cirúrgico envolveu as seguintes etapas: a) exposição da área doadora do enxerto ósseo em bloco; b) fixação do enxerto ósseo em bloco com parafuso de metal e; c) instalação de quatro parafusos de osso bovino recobertos pelo perióstio.

Realizou-se profilaxia antibiótica, duas horas antes de cada cirurgia, com administração intramuscular, dose única, de antibiótico de 40.000 U por quilo de peso do animal (Pentabiótico® - Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

A anestesia geral foi induzida pela administração intra-venosa de tiopental sódico (Thionembital® - Abbot Laboratories North Chicago – Illinois, E.U.A.) na dose de 1,0 ml/kg e complementada com anestesia local (xilocaína a 2% - Merrel – Lepetit Farmacêutica Ltda., Santo Amaro, S.P., Brasil). Previamente aos procedimentos cirúrgicos, os cães foram sedados com cloridrato de dihidrotiazina intramuscular (Rompum® - Bayer S.A. – Saúde Animal, São Paulo, SP), na dose de 1,5ml/10kg, visando o relaxamento muscular generalizado do animal e otimizando o efeito da anestesia geral. Realizou-se uma incisão horizontal na tíbia dos cães visando o acesso cirúrgico ao tecido ósseo. As duas áreas cirúrgicas ficaram separadas entre si por uma distância de aproximadamente 1 cm. O sítio receptor foi descorticalizado por meio de perfurações com ponta esférica nº. 8.

A técnica de enxerto aposicional envolveu a coleta de um bloco de tecido ósseo da região inferior da tíbia, transferindo-o para a região superior do sítio receptor (Fig. 3). Em seguida, o bloco foi fixado por meio de um parafuso metálico da Neodent® (JJGC Indústria e Comércio de Materiais Dentários Ltda, Paraná - Brasil) (Fig.3). A inserção dos parafusos de osso cortical bovino, seguiu a mesma técnica para a inserção de implantes dentários. O leito receptor foi perfurado por meio da broca *twist drill* de 2,0mm de diâmetro, em alta rotação (1600). A perfuração foi realizada até atingir 8,5mm de profundidade. As brocas utilizadas foram do Kit Cirúrgico para instalação de implantes dentários do Sistema Neodent. (Neodent®-JJGC Indústria e Comércio de Materiais Dentários Ltda., Paraná - Brasil). Na etapa subsequente, utilizou-se uma broca cônica da *Osseotite NT MicroMini* de

3,25 x 8,5mm, da marca 3i para dar forma cônica à perfuração, sob alta velocidade (1600rpm). Utilizou-se uma broca macho-de-tarracha *Osseotite NT MicroMini*, de 3,25 x 8,5mm, da marca 3i (Fig. 4) para a confecção das roscas. Em seguida, os parafusos de osso cortical bovino foram parafusados, com auxílio de uma catraca (Nobelbiocare (Nobelbiocare® - Suécia) (Fig. 5), até alcançarem resistência manual

Após a conclusão dos procedimentos cirúrgicos, os tecidos foram coaptados e suturado em camadas para o fechamento completo da ferida cirúrgica. Nas áreas internas utilizou-se o fio de sutura Vicryl absorvível 4-0 (Ethicon-Vicryl® Johnson & Johnson–São Paulo, Brasil). Utilizou-se o fio de nylon 4-0 (Somerville® - Pernambuco, Brasil) para suturar a pele. Logo após a cirurgia os cães foram agasalhados com um cobertor de lã para manter a temperatura corporal e foram acompanhados até o fim do efeito anestésico. Cessado o efeito anestésico os cães foram transferidos para as suas respectivas baias no BC-UFSC onde foram supervisionados diariamente até o término da pesquisa. Os animais receberam analgésico e antiinflamatório por administração intramuscular na dose de 0,14 ml/kg (Banamine® Schering-Plough S/A, Rio de Janeiro, RJ) por sete dias, para controle da dor e do edema pós-operatórios.

Aplicação dos marcadores ósseos para fluorescência

No período pós-operatório, aplicaram-se marcadores ósseos que reagem com a apatita óssea, permitindo a marcação dos períodos de deposição do osso neoformado¹⁷. Administraram-se diferentes corantes em períodos diferentes objetivando visualizar a morfologia do osso em formação. Os marcadores teciduais podem não se depositar após o período de sua administração; dessa forma, podem a fluorescência pode não ocorrer na

região onde ocorreu a neoformação óssea. Para minimizar este problema utilizou-se a dupla aplicação dos marcadores como preconizado na literatura.²⁷ A formulação, dosagem e tempo de aplicação dos marcadores estão apresentados no Quadro I. Os marcadores fluorescentes foram diluídos em solução tampão de fosfato de sódio (Na_2HPO_4) no subcutâneo dos cães, em períodos pré-estabelecidos.

Os três marcadores foram observados sob microscópio de fluorescência. A metodologia aplicada permitiu a visualização da velocidade de deposição óssea. A distância entre as faixas fluorescentes é proporcional à velocidade de crescimento ósseo. A coloração correspondentes a cada um dos marcadores foi: vermelho para a Alizarina, verde para Calceína e amarelo-alaranjado para a tetraciclina.

Segunda Etapa Cirúrgica

Os animais foram divididos em 3 grupos de 6 cães cada. Os grupos foram avaliados 2, 4 e 6 meses após a primeira intervenção cirúrgica. O segundo ato cirúrgico envolveu a remoção das amostras de tecido ósseo, com auxílio de uma trefina de 5 mm de diâmetro (Neodent® -JJGC Indústria e Comércio de Materiais Dentários Ltda., Paraná - Brasil) (Fig. 6), para análise microscópica. Os procedimentos pré, trans e pós-cirúrgicos foram os mesmos executados na primeira etapa cirúrgica, uma vez que os animais não foram sacrificados. A remoção das amostras foi realizada na região central dos enxertos, em uma profundidade que permitisse alcançar o tecido ósseo neoformado, o parafuso de osso cortical bovino e o osso remanescente do cão. As amostras foram devidamente fixadas em recipientes apresentando 10% de formol.

Processamento Histológico

Técnica histológica para tecido mineralizado

Utilizou-se o aparelho do sistema EXAKT para a secção das amostras por micro-desgaste. O diagnóstico histológico foi realizado por trans-iluminação, permitindo assim a avaliação da interface intacta.¹⁹

Após a fixação das amostras, elas foram re-fixadas após redução em uma espessura de 2 a 4 mm, para permitir uma melhor fixação dos tecidos. Em seguida, as amostras foram lavadas em água corrente por 2 horas para eliminação do agente fixador. Foram desidratadas por embebição em soluções de álcool etílico em concentrações crescentes de 60% até 100%, 3 dias em cada e sob agitação. A etapa seguinte foi a inclusão das amostras em material acrílico. Esta etapa envolveu a infiltração das amostras em uma seqüência de glicometacrilato em concentrações crescentes, por 3 dias sob agitação. Em seguida, as amostras sofreram infiltração duas vezes em glicometacrilato puro. Os espécimes infiltrados foram colocados em moldes apropriados para inclusão e foram realizadas as seqüências preconizadas pelo Sistema EXAKT.

RESULTADOS

Análise das lâminas no microscópio de fluorescência.

Criou-se escores conforme a presença dos marcadores ósseos fluorocromáticos nas regiões: osso ileso do cão, parafuso de osso cortical bovino, ou em ambos. Uma vez que a área analisada já constava ser a interface entre o osso do cão e o parafuso de osso bovino, optou-se por considerar o aparecimento de fluorescência em qualquer uma destas duas superfícies como sendo equivalente. Os marcadores ósseos com coloração fluorescente específica indicam a atividade neoformadora de osso no exato momento em que foram aplicados. O pior escore foi determinado quando nenhuma fluorescência era vista na lâmina (escore zero) e o melhor escore foi determinado quando os três tipos de fluorescência foram observados nas duas superfícies (escore dez). Obtidos os dados da microscopia, realizou-se um teste de Kruskal-Wallis para a obtenção do resultado estatístico.

Uma vez selecionada a área de análise, esta região foi fotografada com câmera digital acoplada ao microscópio de fluorescência. As fotografias das lâminas foram então analisadas por um único examinador “cego” e devidamente calibrado quanto à presença ou não dos marcadores ósseos para fluorescência. Obteve-se uma única lâmina para a análise de cada experimento. Foram descartadas as amostras de 3 cães, resultando em 15 amostras totais. Dois deles fraturaram a tíbia após a primeira etapa cirúrgica e um outro contraiu uma infecção urinária. Os animais foram então divididos em grupos conforme o período de observação e o experimento realizado:

Grupo I - Parafusos de osso, análise de 2 meses

Grupo II - Parafusos de osso, análise de 4 meses

Grupo III - Parafusos de osso, análise de 6 meses

Grupo IV - Enxerto Aposicional Autógeno (bloco), análise de 2 meses

Grupo V - Enxerto Aposicional Autógeno (bloco), análise de 4 meses

Grupo VI - Enxerto Aposicional Autógeno (bloco) , análise de 6 meses

O Quadro II evidencia os escores utilizados, e as figuras 7-11 mostram as fluorescências de dois espécimes envolvidos na pesquisa. Os dados foram submetidos ao teste estatístico *Kruskal-Wallis*. Os resultados mostraram que houve diferença significativa entre os grupos, $T = 14.66$ ($p = 0,0119$). As comparações entre todos os grupos mostram os seguintes resultados. Não houve diferença entre os grupos que receberam o parafuso de osso cortical bovino ou o grupo que recebeu enxerto ósseo autógeno aposicional. Isto é, não há ganho de osso significativo ao se esperar períodos pós-operatórios maiores que 2 meses para ambos os grupos. O Grupo 1 (parafuso de 2 meses) foi estatisticamente melhor que os 3 Grupos com enxerto autógeno aposicional. O Grupo 2 (parafuso de 4 meses) foi estatisticamente melhor que o grupo 6 (enxerto autógeno aposicional).

Análise dos Escores

A simulação estatística ofereceu a oportunidade de observar que nos grupos 1, 2 e 3 houve quantidade mais expressiva de fluorescência em 2 meses, pois em 4 meses a fluorescência se estabiliza e em 6 meses ela diminui denotando uma redução na neoformação óssea. Já nos grupos 4, 5 e 6 a quantidade de fluorescência foi equivalente, o que sugere que também após 2 meses pode-se ter o ápice da neoformação óssea vista sob os achados da fluorescência, porém com considerável reabsorção do material do enxerto nos grupos 5 e 6. Sabendo que a partir do momento em que cessa a neoformação óssea ter-se-ia a presença mais marcante da reabsorção óssea, nos grupos dos parafusos seria ideal ser utilizado o enxerto em 2 meses.

DISCUSSÃO

O parafuso de osso cortical bovino provindo do osso bovino mineralizado desproteínizado (OMBD) pode ser uma alternativa interessante como material de preenchimento nos procedimentos de regeneração óssea indicados nos procedimentos pré-protéticos em portadores de atrofia óssea, devido ao seu potencial osteocondutor.²⁰ Schiochett (2002) realizou o primeiro estudo histológico *in vivo* com os parafusos de osso bovino. A escassez de trabalhos nesta linha de pesquisa dificulta a discussão do presente estudo. Observando as inúmeras vantagens do OBMD, pesquisadores do CEPID e GRUCON da UFSC, em desenvolvimento parafusos de osso para uso nos procedimentos pré-protéticos. Mora²¹, iniciou um trabalho pioneiro com a fabricação de implantes ortopédicos a partir de usinagem de osso cortical humano. O osso cortical bovino, principalmente da região da tíbia e do fêmur, apresenta propriedades estruturais superiores ao humano.²² Embora não apresentem a mesma resistência dos parafusos metálicos, os parafusos de osso podem concorrer com estes e com os polímeros em procedimentos como fixação de fraturas em regiões anatômicas onde as cargas sobre os parafusos não são elevadas. Há a necessidade da realização de novas pesquisas para avaliar outras propriedades físicas do parafuso de osso, como sua resistência ao cisalhamento. Dando seqüência aos estudos a partir do modelo de Mora², procurou-se encontrar um material que eliminasse qualquer possibilidade de transmissão de doenças e ainda mantivesse a capacidade de formação óssea. Salles²³ desenvolveu parafusos usinados em osso cortical bovino desproteínizado, realizando testes mecânicos de resistência. Este estudo teve o objetivo de desenvolver um parafuso com utilidades mais direcionadas para as necessidades da área odontológica, tendo

o autor conduziu seu trabalho para auxiliar nas cirurgias corretivas ósseas. Os resultados sugeriram que este material pode ser classificado como biomaterial com características osseocondutora, na medida em que se constitui em matriz física e absorvível, propriedades facilitadoras na recuperação de áreas ósseas perdidas.²⁴ Após os primeiros testes mecânicos realizados, iniciou-se os estudos clínicos histológico em animais. Schiochett²⁰ realizou uma análise microscópica do comportamento tecidual de parafusos de osso bovino instalados em tíbia de coelho, utilizando o parafuso desenvolvido por Salles.²³ Este trabalho mostra o comportamento histológico da osseocondução do osso bovino, comprovando sua viabilidade clínica. O autor observou macroscopicamente, a presença de crescimento ósseo vertical associado aos sítios experimentais dos coelhos que receberam o parafuso de osso. Todas as peças apresentaram a cabeça do parafuso completamente livre do corpo do mesmo. No presente estudo, observou-se crescimento vertical na maioria das amostras. No grupo dos parafusos de osso cortical bovino, ocorreu o destravamento de alguns parafusos na sua totalidade, no entanto, não houve desprendimento isolado da cabeça do parafuso. Sugere-se que este fenômeno possa ter ocorrido devido a traumas localizados proporcionados pelo comportamento natural irrequieto próprio dos animais. A fixação do bloco por um parafuso metálico ofereceu uma proteção natural contra traumas, evitando assim o deslocamento dos parafusos, porém, estatisticamente a reabsorção deste enxerto foi significativamente maior comparado com o grupo que recebeu enxerto ósseo aposicional, com o passar dos meses, e com isso, a “vantagem” apresentada pelo grupo que recebeu o parafuso de osso foi anulada.

As análises histológicas em microscópio óptico (com aumento final de 250 vezes)²⁰ demonstraram haver absorção completa dos parafusos (exceto no coelho 1), com

substituição por tecido ósseo saudável, sem áreas necróticas e sem áreas de absorção acentuada. A presença abundante de osteócitos (osteoblastos aprisionados devido à velocidade da formação da matriz orgânica) caracterizou o tecido ósseo em neoformação. Estas observações também foram verificadas no presente estudo tanto no grupo dos parafusos isolados como no grupo dos parafusos recobertos por membrana. Em algumas amostras observou-se grande crescimento ósseo a partir do perióstio remanescente²⁰. Este fato sugere que a presença física do parafuso pode criar e manter um espaço subjacente ao perióstio que pode ser preenchido por tecido ósseo oriundo do mesmo (papel semelhante à Regeneração Óssea Guiada). Constatou-se, ainda, em todas as amostras, ausência de células inflamatórias e de fibrose. Estas observações também ocorreram no presente estudo no grupo que recebeu os parafusos. Nas amostras apresentadas os parafusos, apesar dos traumas provocados pelos animais, eles ainda permaneceram no local. Observou-se crescimento ósseo vertical que, provavelmente, foi oriundo de células do endósseo e do perióstio, pois não havia o isolamento proporcionado pelas membranas. Obviamente, no grupo dos blocos autógenos, macroscopicamente houve formação óssea mais uniforme, pois o mesmo havia sido fixado na sua forma retangular, sem espaços entre o “corpo” do enxerto. Contrariamente, os grupos que receberam os parafusos, houve a necessidade de preenchimento de osso neo-formado entre eles. Contudo o osso que cercava os parafusos pareceu ser mais maduro comparado com o osso que cercava os blocos autógenos. Isto pode ser explicado pela presença de duas fontes produtoras de osso: o endósseo e o perióstio. Desta forma podemos sugerir que, caso mais parafusos fossem mantidos com suas cabeças em posição de uma maneira quantitativamente maior, estes teriam um ganho substancial em altura óssea, sem o risco de traumas externos influenciarem o espaço subperióstio. Pesquisadores analisaram a resistência mecânica em implantes de osso por meio

de um enfoque numérico e experimental, com um direcionamento mais voltado para a ortopedia, na redução de fraturas. Este estudo comparou o comportamento do parafusos de osso em relação ao de titânio. Além dos resultados biomecânicos, os autores observaram que uma forma de eliminar organismos infecciosos de enxertos ósseos é o da irradiação por raios gama, sendo que dosagens de 30 a 60 kGy são usadas com este intuito. O uso correto de liofilização e irradiação, provoca um acréscimo no módulo de plasticidade e uma redução nas tensões de escoamento e ruptura. Isto é, a radiação entre 10 a 30 kGy não apresenta alterações importantes e representativas; entretanto, acima deste valor foram observadas reduções significativas na resistência de cerca de 35% à torção e 30% à flexão. Estas dosagens são geralmente utilizadas no tratamento de enxertos ósseos congelados e foram as mesmas utilizadas no tratamento do osso utilizado para fabricação dos parafusos utilizados no presente estudo. A otimização da macrogeometria e avaliação da resistência à torção de parafusos de osso cortical bovino foi estudada por Oliveira.¹⁶ A macroestrutura anteriormente desenvolvida no trabalho de Salles²³ e que foi usada, *in vivo*²⁰ apresentou como deficiência uma suscetibilidade a fratura. Pelos resultados deste estudo, o autor sugeriu que os parafusos de osso bovino poderiam ser utilizados em pesquisas, *in vivo*, já que sua resistência ao parafusamento manual foi comprovada. Adicionalmente, concluiu-se que os parafusos deveriam ser reidratados antes da utilização clínica, pois o processo de liofilização interfere nas propriedades mecânicas do osso tratado, reduzindo o módulo de elasticidade, a deformação e a energia de ruptura. Uma forma de amenizar estes empecilhos é a utilização de técnicas de rehidratação. Pesquisas citadas²² demonstraram que o osso cortical bovino, após ser liofilizado a -30°C, foi reidratado em solução salina por 2h à temperatura de 20°C, recuperando parcialmente suas propriedades. A utilização desta

técnica reduziu sensivelmente a fratura dos parafusos de osso durante os procedimentos cirúrgicos de inserção dos mesmos na tíbia de cães no presente estudo.

Na cirurgia inicial de colocação dos enxertos (grupos do parafuso de osso e grupos do enxerto autógeno aposicional), os resultados obtidos vieram de encontro a vários dados,^{24,25} os quais indicam que o novo suprimento vascular emana das perfurações criadas cirurgicamente na cortical óssea. Tais perfurações também foram executadas no presente estudo ao redor e entre os parafusos de osso.

Ao se analisar os cortes histológicos no microscópio de fluorescência, percebeu-se que a partir do décimo quarto dia da inserção dos parafusos de osso até aproximadamente no quarto mês, houve presença de dois marcadores da atividade óssea. Este dado sugere a ocorrência de um intenso metabolismo do tecido ósseo na área da interface entre os parafusos de osso e o osso próprio dos cães. A ausência de um dos marcadores ósseos no presente estudo esta em concordância com a literatura.^{26,27} Sugere-se que este dado seja referente à ação deste marcador ósseo como interferente na mineralização óssea. Porém esta deficiência só poderia ser detectada após a administração de dosagens superiores a 60 mg/kg, no presente estudo, a dosagem não ultrapassou este limite. Os resultados deste estudo estão em concordância com a literatura.^{27,28} Contudo, demonstrou-se que a tetraciclina tem uma tendência a misturar-se ou ser mascarada pelo marcador verde (calceína) devido a sua fraca fluorescência e baixa visibilidade.²⁹ Para minimizar este problema utilizou-se a dupla aplicação dos marcadores como preconizado por vários autores.^{26,27}

Sugere-se que a maior deposição de tecido ósseo nas fases de aplicação do marcador calceína seja pela presença da hidroxiapatita que é considerada bioativa,³¹⁻³³

promovendo uma forte união com o tecido ósseo por meio da presença de grandes quantidades de íons cálcio, oriundos do meio extracelular. Os íons cálcio aumentam o Ph local, diminuindo a ação do processo inflamatório inicial.

Por outro lado, vários autores ^{26,27,30} observaram que a prevalência do marcador calceína (verde), em detrimento dos outros dois marcadores, pode ocorrer em função do quadro inflamatório inicial, impossibilitando a secreção de maior quantidade de matriz óssea orgânica durante os períodos iniciais do reparo. Porém, o tecido ósseo primário formado logo após o trauma cirúrgico, é rapidamente reabsorvido e substituído por tecido ósseo secundário, que após um certo período, remodela-se em tecido cortical maduro. Sendo assim, o marcador alizarina (vermelho) administrado no período inicial de cicatrização, é parcialmente reabsorvido para dar lugar a calceína, depositada em maior quantidade. Estas conclusões podem ser extrapoladas e explicarem os fenômenos semelhantes ocorridos no presente estudo.

Sugere-se, que a ausência do marcador ósseo alizarina no presente estudo, pode ser devido à uma relação existente entre as fases de reabsorção e neoformação óssea. Após um trauma cirúrgico, inicia-se a reabsorção óssea por meio dos osteoclastos. Na atual pesquisa isto ocorreu tanto no osso do cão quanto no parafuso de osso bovino. É possível que nas duas primeiras semanas, quando aplicamos o marcador alizarina, ocorria um forte processo de reabsorção com muito pouca neo-formação óssea, o que dificultou o aparecimento da alizarina (vermelha).

A simulação estatística nos ofereceu a oportunidade de observar que nos grupos 1, 2 e 3, dos animais que receberam o parafuso de osso, tivemos uma quantidade mais expressiva de fluorescência na análise de 2 meses. Na análise de 4 meses, a fluorescência se

estabiliza e em 6 meses ela diminui denotando uma redução da neo-formação óssea. Já nos grupos 4, 5 e 6, que recebeu enxerto ósseo autógeno aposicional, fixado por parafuso metálico, a quantidade de fluorescência foi equivalente. Adicionalmente, a análise de fluorescência permite sugerir que, após 2 meses, ocorreu o apogeu da neoformação óssea.

Analisando os resultados do ganho em altura óssea, foi constatado que, embora a diferença estatística seja insignificante, em relação à média de altura óssea obtida após 2, 4 e 6 meses de avaliação, observou-se que os dados macroscópicos comprovam os achados histológicos. Embora tenha sido considerado apenas a macroscopia, a altura do grupo do enxerto autógeno aposicional, observamos que os resultados deste grupo ocorreu também em algumas amostras do grupo recebendo os parafusos de osso cortical bovino, demonstrando que quando o parafuso permanecesse no sítio receptor, existiu um forte estímulo ao crescimento ósseo vertical. O intervalo de 6 meses de análise, mostrou uma ligeira redução no ganho da altura óssea. Conclui-se que, nesta fase, o processo de absorção foi muito maior, resultando na diminuição do volume do enxerto. Este dado esta em concordância com os dados obtidos na análise histológica por fluorescência, que indica a necessidade de 6 meses de espera antes de considerar o enxerto em condições de uso.

CONCLUSÕES

1- A absorção do parafuso de osso cortical bovino com conseqüente preenchimento ósseo, em conjunto com a obtenção de ganho ósseo vertical considerável na totalidade das amostras, da presença de tecido ósseo em neo-formação e da ausência de osso necrótico: células inflamatórias e fibrose, confirmam os resultados obtidos por outros autores anteriormente.^{20,25} Estes dados sugerem que os parafusos de osso bovino possam ser utilizados, em humanos, como material de preenchimento nas técnicas de aumento de rebordo.

2 – Histologicamente houve diferenças estatísticas significativas, entre as técnicas com aplicação de parafusos de osso bovino e de blocos de enxertos autógenos posicionais fixados com um parafuso central. Apesar desta pesquisa não ter o objetivo de mensurações macroscópicas, observou-se aumento uniforme e vertical nos grupos aonde foram utilizados parafusos de osso bovino, principalmente no grupo de 2 meses de observação, com uma menor perda de massa óssea aos 6 meses em comparação com o outro grupo. A utilização isolada dos parafusos propiciou aumentos verticais significativamente maiores. Este dado sugere o seu uso nas cirurgias pré-protéticas para futura reabilitação por meio de próteses sobre implantes dentários. Adicionalmente, a menor resistência encontrada no uso isolado dos parafusos de osso bovino, sugere um processo de reparação óssea mais avançado.

3- O uso de marcadores ósseos permitiu verificar a ocorrência de um apogeu precoce na neoformação óssea quando utilizando o parafuso de osso de forma isolada. Sugere-se, então, a possibilidade de instalação precoce de implantes dentários nas regiões enxertadas. Contudo, outros estudos são necessários para a indicação do momento ideal da inserção de

implantes dentários após cirurgia de aumento de volume ósseo utilizando a técnica de inserção de parafusos de osso cortical bovino.

REFERENCIAS

1. Hising P, Bolin A, Branting C. Reconstruction of Severely Resorbed Alveolar Ridge Crest with Dental Implants Using a Bovine Bone Mineral for Augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;16:90–97.
2. Garg AK. Augmentation grafting of the maxillary sinus for placement of dental implants: Anatomy, physiology, and procedures. *Implant Dent* 1999;8:36–46.
3. Block MS, Kent JN, Kallukaran FU, Thunthy K, Weinberg R. Bone maintenance 5 to 10 years after sinus grafting. *J Oral Maxillofac Surg* 1998;56:706–714.
4. Breine U, Brånemark P-I. Reconstruction of alveolar jaw bone. An experimental and clinical study of immediate and preformed autologous bone graft in combination with osseointegrated implants. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1980;14:23–48.
5. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop* 1983;174:28–42.
6. Van der Wal KG, de Visscher JG, Stoelinga PJ. The autogenous inner table iliac bone graft. A review of 100 patients. *J Maxillofac Surg* 1986;14:22–25.
7. Pinholt EM, Bang G, Haanaes HR. Alveolar ridge augmentation in rats by Bio-Oss. *Scand J Dent Res* 1991;99:154–161.
8. Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjørting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE, Nat R. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:55–66.
9. Valentini P, Abensur D. Maxillary sinus floor elevation for implant placement with demineralized freeze-dried bone and bovine bone (Bio-Oss): A clinical study of 20 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1997;17:233–241.
10. Valentini P, Abensur D, Densari D, Graziani JN, Hämmerle CHF. Histological evaluation of Bio-Oss in a 2-stage sinus floor elevation and implantation procedure. A human case report. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:59–64.
11. Corn H. Periosteal separation: Its clinical significance. *J Periodontol* 1962;33:140-153.
12. Gaggi A, Schultes G, Karcher H. Distraction implants – A new possibility for the augmentative treatment of the edentulous atrophic mandible. Case report. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999;37:481-485.
13. Urbani G, Lombardo G, Santi E, Consolo U. Distraction osteogenesis to achieve mandibular vertical regeneration: A case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1999;19:321-332.

- 14.** Jensen OT, Cockrell R, Kuhike L, Reed C. Anterior maxillary alveolar distraction osteogenesis: A prospective 5-year clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:52-68.
- 15.** Davis H, Rydevik B, Lundborg G, Danielsen N, Hausamen JE, Neukam F. Mobilization of the inferior alveolar nerve to allow placement of osseointegratable fixtures. In: Worthington P, Branemark P-I (eds). *Advanced Osseointegration Surgery: Applications in the Maxillofacial Region*. Chicago: Quintessence, 1992:129-144.
- 16.** Oliveira OMR. Otimização da macrogeometria e avaliação da resistência à torção de parafusos de osso cortical bovino desproteínizado [dissertação]. Florianópolis(SC): Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.
- 17.** Haas R, Donath K, Fodinger M, Watzek G. Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus grafting: comparative histomorphometric findings in sheep. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:107-116.
- 18.** Allegrini Júnior S. Atuação da proteína morfogenética óssea bovina ou complexo vitamínico, associados a hidroxiapatita natural, no processo de osteointegração em diferentes superfícies de implantes de titânio [tese]. São Paulo(SP): Universidade de São Paulo, 2003
- 19.** Magini RS. Análise Comparativa do Comportamento de Implantes de Ti c.p. com Diferentes Meios de Armazenagem. Análises Microscópica e Torque de Remoção. Baurú(SP) : Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade de São Paulo, 1997.
- 20.** Schiochett C. Análise microscópica do comportamento tecidual de parafusos de osso bovino instalados em tibia de coelho [dissertação]. Florianópolis(SC): Programa de Pós-Graduação em Odontologia , Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.
- 21.** Mora Far. Fabricação de implantes ortopédicos a partir de usinagem de osso humano [tese]. Florianópolis(SC): Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.
- 22.** Cowin S. *Bone mechanics handbook*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2001.
- 23.** Salles B. Usinagem de parafuso de osso cortical bovino liofilizado [dissertação]. Florianópolis(SC) : Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.
- 24.** Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes a clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg* 1996; 54: 420-433.

25. Carpio L, Loza J, Lynch S, Genco R. Guided bone regeneration around endosseous implants with anorganic bovine bone mineral a randomized controlled trial comparing bioabsorbable versus non-resorbable barriers. *J Periodontol* 2000;71:1743-1749.
26. Beck JT. Avaliação da interface implante/osso de implantes de uso odontológico em tíbias de coelhos [tese]. São Paulo (SP): Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo,1997.
27. Allegrini Júnior S. Atuação da proteína morfogenética óssea bovina ou complexo vitamínico, associados a hidroxiapatita natural, no processo de osteointegração em diferentes superfícies de implantes de titânio [tese]. São Paulo(SP): Universidade de São Paulo, 2003.
28. Simmons DJ, Chang SL, Russel JE, Grazman B, Webster D, Oloff C. The effect protracted tetracycline treatment on bone growth and maturation. *Clin Orthop Relat Res* 1983:253-259.
29. Sun TC, Mori S, Roper J, Brown T, Hooser T, Burr DB. Do different fluorochrome labels give equivalent histomorphometric information?. *Bone* 1992;13:443-446.
30. König Júnior B, Beck TJ, Kappert HF, Kappert CC, Masuko TS. A study of different calcification areas in newly formed bone 8 weeks after insertion of dental implants in rabbit tibias. *Ann Anat*, 1998;180:471-475.
31. De Groot K, Geesink R, Klein CP, Serekian P. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. *J Biomed Mater Res* 1987;21:1375-1381.
32. Lorenzetti M, Mozzati M, Campanino PP, Valente G. Bone augmentation of the inferior floor the maxillary sinus with autogenous bone or composite bone grafts: a histologic-histomorphometric preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Implants*1998;13:69-76.
33. Zendron MV. Estudo da formação óssea vertical em torno de implantes dentários obtida por um dispositivo de exclusão tecidual e modificada pelo emprego de osso autógeno, osso bovino inorgânico e vidro bioativo. Análise morfométrica em cães [tese]. Bauru(SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2001.

FIGURAS

Figura 1)



Figura 2)



Figura 3)

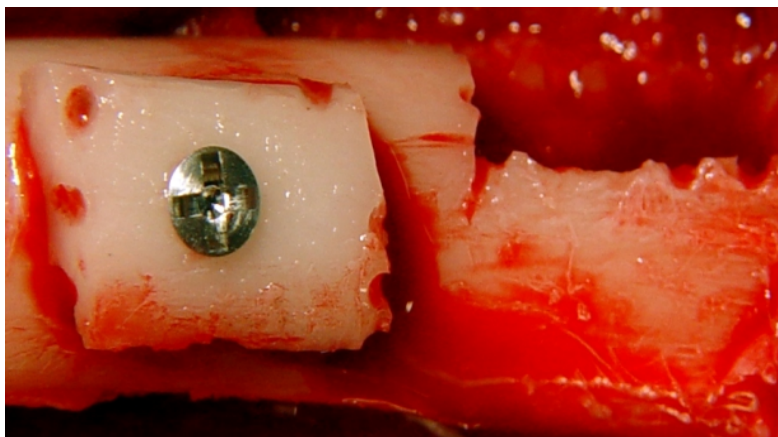


Figura 4)



Figura 5)

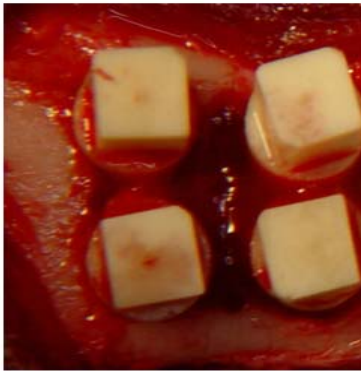


Figura 6)

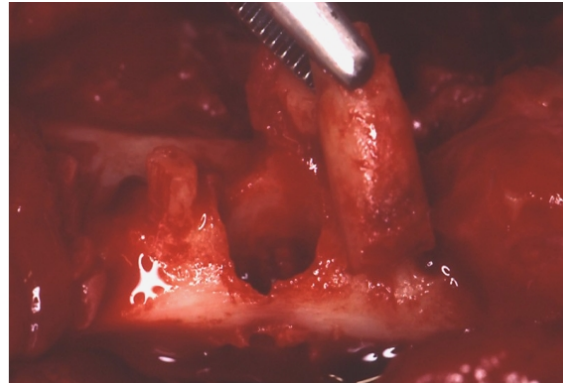


Figura 7)

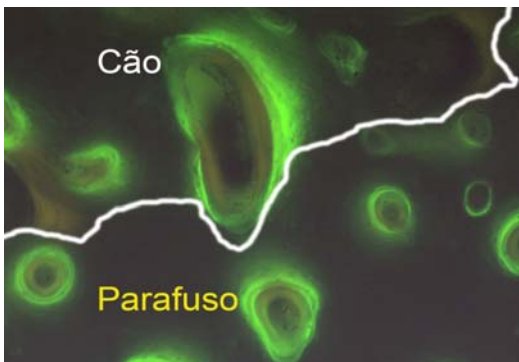


Figura 8)

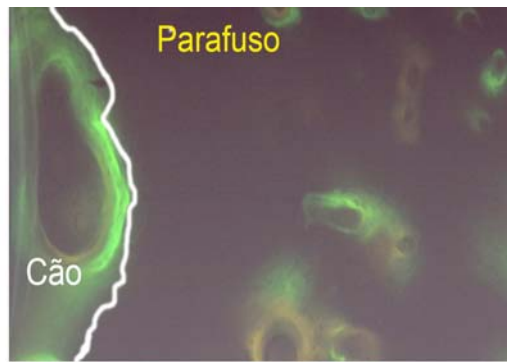


Figura 9)

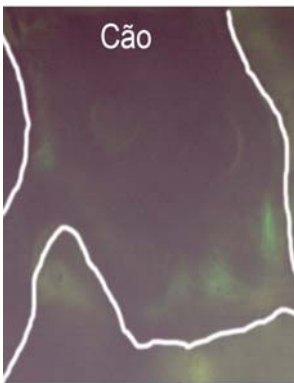


Figura 10)

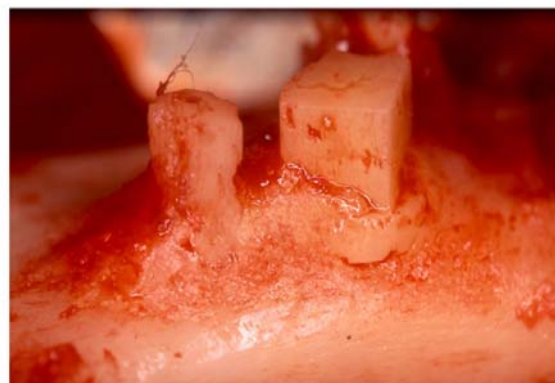
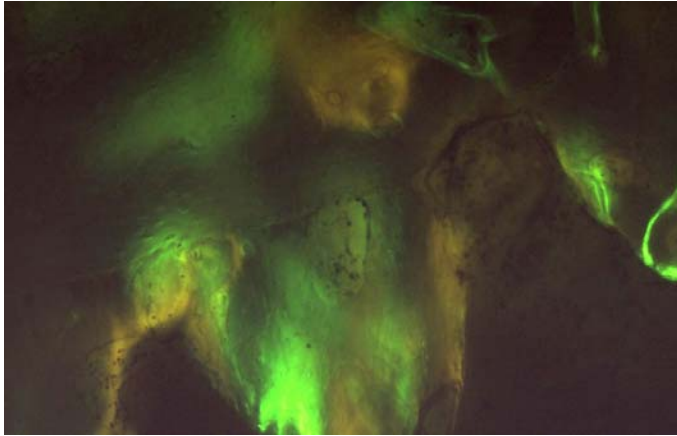


Figura 11)



LEGENDAS

Fig. 1) Anel de osso cortical bovino antes da usinagem dos parafusos.

Fig. 2) Parafuso de osso cortical bovino apresentando a forma preconizada por Oliveira (2005).

Fig. 3) Enxerto ósseo autógeno aposicional fixado. Observe a dimensão da osteotomia realizada na área doadora.

Fig. 4) Broca para confecção de rosca para implantes *Osseotite NT MicroMini*, com diâmetro de 3,25 x 8,5 mm (3i), para confecção das roscas internas do leito receptor.

Fig. 5) Inserção dos parafusos de osso bovino a ser recoberto pelo periósteo. Note a presença de perfurações na região central do enxerto, objetivando facilitar a irrigação no mesmo.

Fig. 6) Remoção das amostras após terem sido trefinadas.

Fig. 7) Grupo dos parafusos de osso no intervalo de 2 meses de análise. Note a presença dos marcadores fluorocromáticos: tetraciclina (alaranjado) e calceína (verde), tanto na superfície do osso do cão como no parafuso de osso. Este dado sugere haver atividade metabólica para a neo-formação óssea.

Fig. 8) Grupo dos parafusos de osso cortical bovino no intervalo de análise de 4 meses. Note a presença dos marcadores fluorocromáticos: tetraciclina (alaranjado) e calceína (verde), tanto na superfície do osso do cão como no parafuso de osso.

Fig. 9) Grupo dos parafusos de osso cortical bovino no intervalo de análise de 6 meses. Note a redução na visualização dos marcadores fluorocromáticos, tanto na superfície do osso do cão como no parafuso de osso.

Fig. 10) Note a osteointegração do parafuso de osso bovino com o sítio receptor do enxerto no intervalo de análise de 4 meses, mostrando um início de reabsorção em algumas áreas. Observe nitidamente o ganho ósseo em 3 dimensões.

Fig. 11) Grupo do enxerto ósseo aposicional no intervalo de análise de 4 meses. Presença dos marcadores fluorocromáticos: tetraciclina (alaranjado) e calceína verde. Os marcadores apresentam-se uniformes com o sítio receptor.

QUADROS

Quadro I: Formulação, dosagem e tempo de aplicação dos marcadores ósseos fluorocromáticos.

TEMPO	SUBSTÂNCIA	DOSE	INJEÇÃO (mg/kg)
14 dias	ALIZARINA*	30mg/kg	3g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
21 dias	ALIZARINA*	30mg/kg	3g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
28 dias	CALCEÍNA**	10mg/kg	1g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
35 dias	CALCEÍNA**	10mg/kg	1g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
42 dias	TETRACICLINA***	60mg/kg	6g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
49 dias	TETRACICLINA***	60mg/kg	6g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
56 dias	AMOSTRAS		

Alizarina* (Labsynth produtos para laboratórios LTDA)

Calceína** (Labsynth produtos para laboratórios LTDA)

Tetraciclina*** (Fosfato complexo de tetraciclina – Bristol-Meyer Squibb Brasil)

Quadro II) Escores utilizados na análise estatística.

Escore	Fluorescência
0	Sem fluorescência
1	Fluorescência alaranjada em uma superfície
2	Fluorescência alaranjada em duas superfícies
3	Fluorescência verde em uma superfície
4	Fluorescência verde em duas superfícies
5	Fluorescência vermelha em uma superfície
6	Fluorescência vermelha em duas superfícies
7	Dois tipos de fluorescência em uma superfície
8	Dois tipos de fluorescência em duas superfícies
9	Três tipos de fluorescência em uma superfície
10	Três tipos de fluorescência em duas superfícies

TABELAS**TABELA I)** Comparações individuais.

Grupos	mediana	média
1) Parafuso 2 meses	8	8
2) Parafuso 4 meses	8	7,83
3) Parafuso 6 meses	7,5	7,5
4) Enxerto com Bloco 4 meses	7	7,2
5) Enxerto com bloco 2 meses	7	6,3
6) Enxerto com bloco 6 meses	7	6,75

MANUSCRIPT**Bovine bone screw: a new alternative to autogenous onlay bone grafts**

This manuscript was formatted according to the author's guidelines for the *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*.

ABSTRACT

Purpose: Compare newly formed bone after bovine cortical bone screw placement and onlay autogenous bone graft procedure.

Methods and Materials: Eighteen female Beagle dog tibias received 4 bovine cortical bone screws and an onlay autogenous bone graft. Both augmentation techniques resulted in newly formed bone. Fluorochromatic bone markers were injected in the dogs in different time intervals. Sections of the samples were analyzed by fluorescence microscopy after 2, 4, and 6 months post-operatively. The fluorochrome markers were alizarin, calceine and tetracycline.

Results: Newly formed bone was observed in sections made of samples collected from both procedures. The bovine cortical bone screw was partially present in the samples and seemed to reduce in quantity as time intervals extended. Additionally, the bone was contiguous to the receptor site. This could be attributed to the bone neoformation. The autogenous onlay bone graft was gradationally substituted after integrated in the receptor site faster than the newly formed bone, suggesting an osseinduction and osseconduction characteristic. The newly formed bone was highly cellular, showing the presence of osteocytes and osteoclasts. Two months postoperatively, the cortical bovine bone screw technique showed statistically significant bone formation compared to the onlay bone graft. This finding was confirmed after 4 and 6 month interval analyses.

Conclusion: The bovine cortical bone screw showed to be highly osteoinductive. The authors suggest its use compared to the onlay autogenous grafts for bone graft augmentation procedures. The bovine cortical screw used for bone augmentation showed to be a better solution in long terms compared to the onlay autogenous bone graft procedure, due to the higher bone resorption in the onlay graft surgical site.

Key-word: Bovine cortical bone screw, autogenous onlay bone graft, bone regeneration.

INTRODUCTION

The bone atrophy which occurs in patients presenting tooth loss can result in functional and esthetic problems. These problems can be minimized with the placement of dental implants to retain of support a fixed prosthesis.¹

Bone augmentation techniques are used to make viable the placement of dental implants. The gold standard for bone augmentation techniques is the use of autogenous bone, which can be collected from intra- and extra-oral areas,³⁻¹⁰ however, bone augmentation in the posterior region of the mandible can be a challenge for the dental surgeon,¹ which also has the option of using the lateral displacement of the inferior alveolar nerve of the mandible. This is a risky technique which can result in undesirable collateral effects for the patient,¹ as burning sensation, paresthesia, hyperesthesia and even mandible fracture.¹⁵⁻²⁰

Distraction osteogenesis is an alternative bone augmentation technique, however, it is a technique indicated for the anterior severely resorbed maxilla. Additionally, there are graft materials: alloplastic and bio-glass, and hydroxiapatite. This group also holds onlay and particulated xenogenous bovine bone.

The present study used bovine cortical bone, formatted in screw, presenting a square head to permit osseointegration.

MATERIAL AND METHODS

Manufacture of the bovine cortical bone screws

The bovine bone used was manufactured by Baumer SA® (Mojí Mirim, São Paulo, Brazil). The animals from which the bone structures were collected were from the same sex, race, and age. Additionally, they were from the same cattle raised by the industry, receiving pasture, and meat accredited by a supplier that offers exportation quality meat. The process which involves killing of the animal, and packing follows the national Ministry of Health requirements, which are according with the international requirements. The preparation of the bovine bone screws was done with the harvesting and removal of muscle residues, tendons, blood and lymphatic vessels, and adipose tissue. Next, the specimens were submitted to chemical and were lyophilized. A cortical bovine bone block (Fig. 1) was machined to produce 200 screws. The screws were submitted to torsion and resistance analyses at the Machining and Number Comand Laboratory (USICON) of the Technological Center of the Mechanical Engineering Department of the Federal University of Santa Catarina (UFSC).

The screws were machined in the same dimensions of the *Osseotite NT MicroMini* (3,25mm x 8,5mm) implants. The dimensions os the head followed the dimensions of the 3i® implant System (3i Implant System, USA) (4,0mm x 4,0mm), showing a final length of 10.0 mm, of which 5 mm are conical screws resembling a trapezoid with 3.0 mm by 2.0 mm in the free extremity and a 0.8 mm of thread distance with 5.0 mm in head length (Fig. 2).¹⁶

After the manufacture of the bovine cortical bone screw, it was submitted to manual torque. Its resistance to the manual torque indicated its use for this study.

Animal selection

Eighteen young female Beagle dogs (*Canis familiaris*), with a mean age of 2 years, were obtained from the Biological Unit (BU) of the UFSC. The dogs presented good health, and were all supervised by the employees of the BU-UFSC. The animals were released for use after the project was approved by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA), protocol number 244/CEUA.

Surgical Procedures

Pre-prosthetic surgery

Beagle dog tibias (Fig. 3) were used as the donor and receptor sites. The surgical procedure involved the following steps: a) exposure of the donor area for the autogenous bone graft, b) bone graft retention made by a metal screw; and, c) placement of 4 bovine cortical bone screws were covered by the periosteum.

Antibiotic prophylaxis was conducted, two hours before each surgery with intramuscular administration of 40.000 units/Kg of the animal's weight (Pentabiótico® - Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

General anesthesia was conducted by the administration of sodium thiopenthal (Thionembotal® - Abbot Laboratories North Chicago – Illinois, E.U.A.) 1.0 ml/kg and complemented by local anesthesia (xylocaine a 2% - Merrel – Lepetit Farmacêutica Ltda., Santo Amaro, S.P., Brasil). Previous to the surgical procedure, the dogs were sedated with intra-muscular Dihydrothiazine chloridrate administration (Rompum® - Bayer S.A. – Animal Health, São Paulo, SP), the dosage of 1.5ml/10kg, was used to promote general muscle relaxation to optimize the general anesthesia. A horizontal incision was conducted on the tibia to promote surgical Access to the bone tissue. Both surgical sites were separated from each other by a 1 cm distance approximately. The receptor site was decorticalized by a round drill number 8.

The onlay bone graft technique involved harvesting of the bone tissue from the inferior area of the tibia, which was transferred to superior region of the receptor site (Fig. 3). Next, the onlay bone graft was retained by a metallic screw (Neodent®, JJGC Indústria e Comércio de Materiais Dentários Ltda, Paraná - Brasil) (Fig.3). The insertion of the bovine cortical bone screw followed the same technique used for dental implant placement. The receptor site was perforated by a 2.0 mm diameter *twist drill*, in high speed (1600 rpm). The perforation was conducted until it reached a 8.5 mm depth. The drills used were acquired from the Neodent® surgical kit. (Neodent®-JJGC Indústria e Comércio de Materiais Dentários Ltda., Paraná - Brasil). The following step involved the use of a conic *Osseotite NT MicroMini* screw of 3.25 x 8.5mm (3i®, USA) to permit a cone shape to the

perforation, under high speed (1600 rpm). The *Osseotite NT MicroMini*, 3,25 x 8,5mm (3i, USA) (Fig. 4) drill was used to make the internal threads in the surgical site. Next, the bovine cortical bone screws were placed by means of a ratchet (Nobelbiocare (Nobelbiocare® - Suécia) (Fig. 5), until they reached resistance.

After the surgical procedure, the tissues were adapted and sutured in layers. The internal areas were sutured with absorbable Vicril 4-0 (Ethicon-Vicryl® Johnson & Johnson–São Paulo, Brasil). Nylon 4-0 threads (Somerville® - Pernambuco, Brasil) was used to suture the skin. After the surgical procedure, the dogs were kept warm to maintain the temperature until the anesthesia finished. After Cessation of the anesthetic effect, the dogs were transferred to their respective locus at the BU-UFSC, where they receive care until the end of the research. The animals received analgesic and anti-inflammatory drug at the dose of 0,14 ml/kg (Banamine® Schering-Plough S/A, Rio de Janeiro, RJ) for 7 days, to control post-operative pain and edema.

Application of the fluorescent bone markers

Fluorescent bone markers were applied post-operatively. The bone markers react with the bone apatite, permitting to mark the period of newly deposited bone.¹⁷ Different color markers were administered in different time intervals to permit visualization of the newly formed bone morphology. The tissue marker may not deposit after their administration; therefore, fluorescence may not occur in the regions of newly formed bone. To minimize this problem, we used double application of the markers, as previously advocated by the literature.²⁷ The formula, dosage and application time interval for the fluorescent bone markers were present on Chart I. The fluorescent bone markers were diluted in phosphate

buffer (Na_2HPO_4) and injected on the subcutaneous of the dogs in the pre-established time intervals. The three fluorescent bone markers were observed by fluorescent microscopy. The applied methodology permitted the visualization of the newly formed bone deposition speed. The distance between the fluorescent dyes indicated the speed in which the bone was being deposited. The color correspondent to each marker was: red, orange and green for alizarin, calceine and tetracycline, respectively.

Second stage surgery

The animals were divided into three groups of 6 animals each. The groups were evaluated at 2, 4 e 6 months post-operatively after the first surgical intervention. The second surgical intervention involved the removal of the samples by means of a 5 mm diameter threphine drill (Neodent ® -JJGC Indústria e Comércio de Materiais Dentários Ltda., Paraná - Brasil) (Fig. 6), for microscopic analyses.

The pre, trans and post-surgical procedures were the same used for the first surgical technique. The animals were not sacrificed. The removal of the samples were on the central region of the grafts, in a deepness that permitted reach the newly formed bone, the bovine cortical screw and the remaining untouched bone. The samples were placed in a recipient with 10% de paraformaldehyde.

Histological procedure

Technique used for mineralized tissue

After the samples were fixed, they were re-fixed after reduction to a width of 2 to 4 mm, to permit a better retention of the tissues. Next, the samples were washed in tap water for 2 hours to eliminate the fixating agent. The samples were dehydrated in alcoholic solutions of crescent concentration. The samples were embedded in acrylic resin. The samples were sectioned by EXAKT equipment. Trans-illumination was used for the histological diagnosis to evaluate the interface integrity.¹⁹

RESULTADOS

Fluorescence analyses

Scores were given according to the presence of fluorochromatic bone markers in the following regions: healthy bone, bovine cortical bone screw, or both. The specific color of the fluorescent markers indicate the newly formed bone activity at the exact moment when they were applied. The scores were determined according to Chart I. Score zero was attributed to the sections without presence of fluorescence in both sides of the interface. Score 10 was attributed to the sections with presence of all three fluorescence in both sides of the interface. The data was compiled and statistical analysis was conducted using the Kruskal-Wallis test.

After the area of analyses was selected the region was photographed with digital camera adapted to the fluorescent microscope. The photographs of the sections were all analyzed by one "blind" examiner and properly calibrated as to the presence of absence of the fluorescent markers. Three dogs were lost during the experiment, resulting in the loss of 15 samples. Two fractured their tibia and one contracted urinary infection.

The animals were divided into groups according to the observation period and the bone graft procedure:

Group I) Bovine bone screw, 2 month analyses;

Group II) Bovine bone screw, 4 month analyses;

Group III) Bovine bone screw, 6 month analyses;

Grupo IV) Autogenous onlay bone graft, 2 month analyses;

Grupo V) Autogenous onlay bone graft, 4 month analyses;

Grupo VI) Autogenous onlay bone graft, 2 month analyses.

The Chart II shows the scores used, and the figures 7-11 show fluorescence of 2 samples. The data were submitted to statistical analyses using the *Kruskal-Wallis* test. The results showed that there was significant statistical difference between the groups, $T = 14.66$ ($p = 0,0119$). The comparison between both groups showed the following results. There was no statistical difference between the groups that received the bovine cortical bone screw or the groups that received the autogenous onlay bone graft, namely, there was no significant bone augmentation post-operatively after 2 months for both groups. Group 1 showed statistical significant difference compared to the other three groups that received autogenous onlay bone graft. Group 2 showed statistically significant bone augmentation compared to group 6.

Score analysis

The statistical analyses showed greater and more expressive fluorescence in the 2 month time interval for groups 1, 2 and 3. The 4 month analysis showed fluorescence stabilization and the 6 month analysis showed fluorescence reduction, indicating a reduction in bone formation. Groups 4, 5 and 6 showed equivalent fluorescence quantity, which suggests that, also, after the 2 month time interval, the maximum bone formation shown by the fluorescence findings. However, considerable autogenous onlay graft bone loss in the groups 5 and 6. Knowing that when bone formation ceases, approximately two

months post-operatively, there would be the most intense bone resorption, in the groups with bovine cortical bone screw, it would be ideal to use the bone graft after two months.

DISCUSSÃO

The bovine cortical bone screw derived from the Deproteinized Mineralized Bovine Bone (DMBB) can be used as a filling material for pre-prosthetic bone augmentation procedures in the atrophied maxilla, due to its osteoconductive potential²⁰ Schiochett (2002) conducted the first histological analysis *in vivo* using bovine bone screws placed in rabbit tibias. The lack of studies using the bovine bone screws makes it difficult to discuss the present study. Observing the many advantages of the DMBB, researchers from the Center of Research and Continuing Education in Implant Dentistry (CEPID) and GRUCON from UFSC, developed bovine bone screws for pre-prosthetic procedures. Mora²¹, initiated a pioneer study with the fabrication of orthopedic implants from the machining of cortical human bone blocks. The bovine bone, especially in the tibia region of the femur, presents structural properties superior to human bone.²² In spite of not presenting the same resistance of the metallic screws, the bone screws can be included as bone graft materials that can be used in areas of low stress. There is a need for new research to evaluate other physical properties of the bone screw, as its shear resistance. Mora's² study gives us insights of the need for a material that may not transmit diseases and also maintain the capacity to form bone. Salles²³ developed bovine cortical bone screws with mechanical resistance. This study aimed to develop a screw presenting properties that are more useful in the dental clinic, for corrective surgeries.

The results from this study suggest that this material can be indicated as a biomaterial with osteoconductive properties, whereas tit is a physical and absorbable matrix, properties that promotes bone recovery.²⁴ After the first mechanical tests conducted,

histological analyses were conducted. Schiochett²⁰ analyzed microscopically bone behavior of the bovine bone screws placed in rabbit tibia, using the screw developed by Salles.²³ This work showed that an osteoconductive histological behavior of the bovine bone, substantiating its clinical viability.

The author observed the presence of vertical bone formation macroscopically, associated to the receptor sites of the rabbit that received the bovine bone screw. All the screws presented the screw head completely free from the body. The present study showed vertical bone formation in most samples. The group that received the bovine cortical bone screw showed some screws to unlock, however, there was no disconnection between the screw head and body. The authors suggest that this phenomena can occur due to local trauma caused by the dogs natural behavior. The retention of the autogenous onlay bone graft with a metallic screw offered a natural protection against trauma, avoiding the dislodgement of the screws, however, statistically, the resorption of the graft was significantly higher compared with the group which received the autogenous onlay bone graft, as time elapsed, Therefore, the advantage presented at first by the bovine cortical bone graft was cancelled.

Histological analysis by means of the optic microscope (250 times magnification)²⁰ demonstrated complete absorption for the bovine screws (except for one rabbit), with substitution of necrotic bone by healthy bone and without necrotic areas of marked bone loss. The presence of abundant osteocytes characterized a newly formed bone. These observations were also shown in the present study in the groups receiving bovine cortical bone screw and autogenous onlay bone graft. Some samples showed great presence of newly formed bone due to the remaining periosteum.²⁰ This fact suggests the physical

presence of the screw creating and maintaining a space subjacent to the periosteum, which can be filled by bone (similar role as the guided bone regeneration techniques). All the samples showed absence of inflammatory cells and fibrosis. These observations also occurred in the present study, on the group receiving the bovine cortical bone screws. The samples presenting the bovine cortical bone screws, despite the trauma caused by the dogs, they still were present in the site. Vertical bone augmentation was present, which were attributed to the periosteum and endosteum. In the groups receiving autogenous onlay bone graft, there was presence of macroscopic continuous bone formation. The onlay graft was closely adapted to the receptor site. Notwithstanding, the groups that received the screws showed the presence of newly formed bone. However, the bone that surrounded the screws seemed to be more mature compared to the bone that surrounded the onlay bone grafts. This can be explained by the presence of two bone producing sources: the endosteum and the periosteum. In this way, the authors suggest that if the screws were maintained with their heads in position, they would show substantial vertical bone augmentation, without the risk of external trauma influencing the sub-periosteal space. Researchers analysed the mechanical resistance of bone implants by means of a numerical experiment. This study compared the behavior of bone screws with titanium screws. In addition to the biomechanical results, the authors observed that gamma-ray irradiation is a form of eliminating infectious organisms from the bone grafts, when used in the dosage of 30 to 60 kGy. The correct use of the lyophilization and the irradiation promotes an increase in the plasticity and reduction in the viscosity and rupture tensions. That is, the radiation between 10 a 30 kGy does not present important and representative modifications; therefore, over this value, significant reductions can be observed in the resistance of approximately 35% in torsion and 30% in flexural resistance. This treatment was the same used for the

fabrication of the bovine cortical screws used in the present study. The evaluation of the torsion resistance of the bone screws was studied by Oliveira.¹⁶ The macrogeometry used developed by Salles²³ was used *in vivo*²⁰ and presented susceptibility to fracture. The author suggested that the bovine screws could be used for *in vivo* research, since their resistance to manual placement was approved. Additionally, they concluded that the screws should be rehydrated before use, because the lyophilization process interferes with their mechanical properties, reducing their elasticity module, deformation and the rupture resistance. A manner to minimize these disadvantages is to use rehydrating techniques. Studies demonstrated²² that bovine bone screws, after lyophilization at -30°C, were rehydrated in saline solution for 2 hours at 20°C, recovered partially their properties. The use of these techniques increased their resistance to fracture during their surgical placement in the dog tibias.

The initial surgeries, the results were in concurrence to the literature,^{24,25} which indicate newly formed vascular tissue flowing from the surgical perforations created on the cortical bone. These perforations were conducted in the present study around and between the bone screws.

While analyzing the histological sections by means of the fluorescent microscope, the 14th day up to the 4th month after the bone screw placement showed presence of two bone activity markers. This data suggests occurrence of an intense bone metabolism in the interface of the bovine bone screw and the healthy dog bone. The lack of one of the bone markers in the present study is in concurrence with the literature.^{26,27} The authors suggest that the data is referring to the bone marker that interferes with bone mineralization. However, this deficiency could only be detected after the administration of dosages

superior to 60 mg/kg, in the present study, the dosage did not surpass this limit. The results from the present study are in concurrence with the literature.^{27,28} However, tetracycline showed is prone to combine or to be masked by the green color, expressed by the presence of calceine, due to its weak fluorescence and low visibility.²⁹ To minimize this problem, double markers were used with the application of the markers as advocated by other authors.^{26,27}

The higher deposition of newly formed bone in the phases of the application of calceine can be due to the presence of hydroxyapatite which is considered bioactive,³¹⁻³³ promoting a strong union between the bone tissue by the presence of great amount of calcium ions, derived from the extracellular medium. The calcium ions increase the local pH, reducing the initial inflammatory process.

Alternatively, many authors^{26,27,30} observed that the prevalence of calceine markers (green), can be due to the initial inflammation, precluding the secretion of a higher amount of bone matrix during the initial period of bone repair. However, the primary bone tissue formed after the surgical trauma, is rapidly resorbed and substituted by secondary bone tissue, which remodels after a certain period of time into lamellar bone. The alizarin marker (red) administered in the initial healing period is partially resorbed to give space to the calceine, deposited in greater amount. These conclusions can infer and explain the similar phenomenon occurring in the present study.

The authors suggest that the absence of the alizarin is due to the existing relation between the newly formed bone and the bone resorption. After a surgical trauma, bone resorption begins by means of the osteoclasts. This occurred in the present study not only in the healthy dog bone but also in the bovine bone screw area. In the first weeks after the

surgery, it is possible that the application of alizarin did not show expression in the samples due to the high bone resorption and reduced bone formation.

CONCLUSIONS

1- Bovine bone resorption with subsequent bone filling, in conjunction with considerable vertical bone augmentation in most samples, the presence of newly formed bone and absence of necrotic bone, confirm the results obtained by other authors.^{20,25} These findings suggest that the bovine cortical bone screw can be used in humans as a filling material in bone augmentation procedures.

2 – Histologically, there was statistically significant difference between the bovine cortical bone screw and the autogenous onlay bone graft procedures fixed with a central metallic screw. Despite this research not aim macroscopic measurements, especially in the group of the 2 month time interval assessment, vertical bone augmentation was observed in the groups where the bovine cortical bone screws were placed, especially at 2 month time interval, with a smaller bone loss at 6 month time interval, compared to the autogenous onlay bone graft. The use of single screws permitted significant increase in the vertical augmentation. These data suggest its use in pre-prosthetic surgeries for future rehabilitations by means of implant fixed prosthesis. Additionally, the increased resistance that occurs while using isolated bovine cortical bone screws suggests that the bone repair process is advanced.

3- The use of bone markers permitted to verify the occurrence of a precocious apogee in bone formation when using the bovine cortical bone screws isolated. The authors suggest the possibility of precocious dental implant placement in these regions. However, other

studies are necessary to indicate the ideal moment for dental implant placement after bone augmentation surgeries using the bovine cortical bone screw technique.

REFERENCES

1. Hising P, Bolin A, Branting C. Reconstruction of Severely Resorbed Alveolar Ridge Crest with Dental Implants Using a Bovine Bone Mineral for Augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;16:90–97.
2. Garg AK. Augmentation grafting of the maxillary sinus for placement of dental implants: Anatomy, physiology, and procedures. *Implant Dent* 1999;8:36–46.
3. Block MS, Kent JN, Kallukaran FU, Thunthy K, Weinberg R. Bone maintenance 5 to 10 years after sinus grafting. *J Oral Maxillofac Surg* 1998;56:706–714.
4. Breine U, Brånemark P-I. Reconstruction of alveolar jaw bone. An experimental and clinical study of immediate and preformed autologous bone graft in combination with osseointegrated implants. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1980;14:23–48.
5. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop* 1983;174:28–42.
6. Van der Wal KG, de Visscher JG, Stoelinga PJ. The autogenous inner table iliac bone graft. A review of 100 patients. *J Maxillofac Surg* 1986;14:22–25.
7. Pinholt EM, Bang G, Haanaes HR. Alveolar ridge augmentation in rats by Bio-Oss. *Scand J Dent Res* 1991;99:154–161.
8. Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjørting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE, Nat R. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:55–66.
9. Valentini P, Abensur D. Maxillary sinus floor elevation for implant placement with demineralized freeze-dried bone and bovine bone (Bio-Oss): A clinical study of 20 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1997;17:233–241.
10. Valentini P, Abensur D, Densari D, Graziani JN, Hämmerle CHF. Histological evaluation of Bio-Oss in a 2-stage sinus floor elevation and implantation procedure. A human case report. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:59–64.
11. Corn H. Periosteal separation: Its clinical significance. *J Periodontol* 1962;33:140-153.
12. Gaggi A, Schultes G, Karcher H. Distraction implants – A new possibility for the augmentative treatment of the edentulous atrophic mandible. Case report. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999;37:481-485.
13. Urbani G, Lombardo G, Santi E, Consolo U. Distraction osteogenesis to achieve mandibular vertical regeneration: A case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1999;19:321-332.

- 14.** Jensen OT, Cockrell R, Kuhike L, Reed C. Anterior maxillary alveolar distraction osteogenesis: A prospective 5-year clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:52-68.
- 15.** Davis H, Rydevik B, Lundborg G, Danielsen N, Hausamen JE, Neukam F. Mobilization of the inferior alveolar nerve to allow placement of osseointegratable fixtures. In: Worthington P, Branemark P-I (eds). *Advanced Osseointegration Surgery: Applications in the Maxillofacial Region*. Chicago: Quintessence, 1992:129-144.
- 16.** Oliveira OMR. Otimização da macrogeometria e avaliação da resistência à torção de parafusos de osso cortical bovino desproteínizado [dissertação]. Florianópolis(SC): Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.
- 17.** Haas R, Donath K, Fodinger M, Watzek G. Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus grafting: comparative histomorphometric findings in sheep. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:107-116.
- 18.** Allegrini Júnior S. Atuação da proteína morfogenética óssea bovina ou complexo vitamínico, associados a hidroxiapatita natural, no processo de osteointegração em diferentes superfícies de implantes de titânio [tese]. São Paulo(SP): Universidade de São Paulo, 2003
- 19.** Magini RS. Análise Comparativa do Comportamento de Implantes de Ti c.p. com Diferentes Meios de Armazenagem. Análises Microscópica e Torque de Remoção. Baurú(SP) : Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade de São Paulo, 1997.
- 20.** Schiochett C. Análise microscópica do comportamento tecidual de parafusos de osso bovino instalados em tíbia de coelho [dissertação]. Florianópolis(SC): Programa de Pós-Graduação em Odontologia , Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.
- 21.** Mora Far. Fabricação de implantes ortopédicos a partir de usinagem de osso humano [tese]. Florianópolis(SC): Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.
- 22.** Cowin S. *Bone mechanics handbook*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2001.
- 23.** Salles B. Usinagem de parafuso de osso cortical bovino liofilizado [dissertação]. Florianópolis(SC) : Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.
- 24.** Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes a clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg* 1996; 54: 420-433.

25. Carpio L, Loza J, Lynch S, Genco R. Guided bone regeneration around endosseous implants with anorganic bovine bone mineral a randomized controlled trial comparing bioabsorbable versus non-resorbable barriers. *J Periodontol* 2000;71:1743-1749.
26. Beck JT. Avaliação da interface implante/osso de implantes de uso odontológico em tíbias de coelhos [tese]. São Paulo (SP): Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo,1997.
27. Allegrini Júnior S. Atuação da proteína morfogenética óssea bovina ou complexo vitamínico, associados a hidroxiapatita natural, no processo de osteointegração em diferentes superfícies de implantes de titânio [tese]. São Paulo(SP): Universidade de São Paulo, 2003.
28. Simmons DJ, Chang SL, Russel JE, Grazman B, Webster D, Oloff C. The effect protracted tetracycline treatment on bone growth and maturation. *Clin Orthop Relat Res* 1983:253-259.
29. Sun TC, Mori S, Roper J, Brown T, Hooser T, Burr DB. Do different fluorochrome labels give equivalent histomorphometric information?. *Bone* 1992;13:443-446.
30. König Júnior B, Beck TJ, Kappert HF, Kappert CC, Masuko TS. A study of different calcification areas in newly formed bone 8 weeks after insertion of dental implants in rabbit tibias. *Ann Anat*, 1998;180:471-475.
31. De Groot K, Geesink R, Klein CP, Serekian P. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. *J Biomed Mater Res* 1987;21:1375-1381.
32. Lorenzetti M, Mozzati M, Campanino PP, Valente G. Bone augmentation of the inferior floor the maxillary sinus with autogenous bone or composite bone grafts: a histologic-histomorphometric preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Implants*1998;13:69-76.
33. Zendron MV. Estudo da formação óssea vertical em torno de implantes dentários obtida por um dispositivo de exclusão tecidual e modificada pelo emprego de osso autógeno, osso bovino inorgânico e vidro bioativo. Análise morfométrica em cães [tese]. Bauru(SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2001.

FIGURES

Figures 1-4) pg 35

Figures 5-10) pg. 36

Figure 11) pg. 37

CHARTS

Chart 1) pg. 40

Chart 2) pg. 41

TABLES

Table 1) pg. 42

LEGENDS

Fig. 1) Bovine bone ring before machined the screws.

Fig. 2) Bovine bone screws with format advocated by Oliveira (2005).

Fig. 3) Autogenous onlay graft retained by a metallic screw. Note osteotomy dimension in the receptor site

Fig. 4) *Osseotite NT MicroMini* drill used to make the internal threads at the receptor site, presenting the dimensions 3.25 x 8.5 mm (3i, USA).

Fig. 5) Placement of the bovine cortical bone screw to be covered by the periosteum. Note the presence of perforations in the central region of the graft, made to facilitate blood circulation.

Fig. 6) Removal of the samples with a trephine drill.

Fig. 7) Group of the bovine bone screw at 2 month time interval analysis. Note presence of the fluorchromatic markers: tetracycline (orange) and calceine (green). There was newly formed bone at the healthy dog bone surface and at the bovine cortical bone screw. This data suggests metabolic activity for newly formed bone.

Fig. 8) The bovine cortical bone screw group at 4 month time interval analysis. Note presence of fluorchromatic bone markers: tetracycline (orange) and calceine (green) in the healthy dog bone surface and in the bovine cortical bone screw.

Fig. 9) Bovine cortical bone screw group at the 6 month time interval. Note the reduction in the fluorescent marker visualization at the healthy dog bone surface and at the bovine cortical bone screw.

Fig. 10) Note osteoconduction of the bovine cortical bone screw at 4 month time interval analysis, showing the beginning of bone resorption in some areas. Observe bone augmentation.

Fig. 11) The autogenous onlay graft at the 4 month time interval. Note presence of fluorochromatic markers: tetracycline (orange) and calceine (green). The markers presented continuous with the receptor site.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

RELAÇÃO DE TRABALHOS PUBLICADOS E ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO DURANTE O DOUTORADO

Artigos publicados:

PONTUAL, M.A.B.; FREIRE, J.N.O.; SOUZA, D.C.; FERREIRA, C.F. et al. Newly designed template device for use with the insertion of immediately loaded implants. *Journal of Implantology*, v. 30; n. 5, 2004.

Trabalhos publicados em Anais de Congressos:

SOUZA, D.C.; PONTUAL, M.B.A.; FERREIRA, C.F. et al. How I utilized micro-screwed prosthesis: the evolution of the implant supported fixed prosthesis. In: World Congress for Oral Implantology 6, Honolulu, Estados Unidos, 2004.

OLIVEIRA, O.M.; MAGINI, R.S.; BIANCHINI, M.A.; FERREIRA, C.F.; PONTUAL, M.A.B. Torsion resistance test of bovine bone screws for bone augmentation. 83rd General Session & Exhibition of the International American Dental Research. *Journal of Dental Research*, v. 84, fasc. A, 2005.

PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S.; BIANCHINI, M.A.; FREIRE, J.N.O.; PONTUAL, M.D.; FERREIRA, C.F. Avaliação de 3 anos em pacientes da 3ª idade utilizando carga imediata em Implantes e Plasma Rico em Plaquetas (PRP). *World Celebration - 40 years of Osseointegration*. 2005.

