



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM PERIODONTIA

CRISTINE D'ALMEIDA BORGES

Avaliação da neoformação óssea após instalação de malhas de
titânio e enxerto ósseo - análise histológica e
microtomográfica *in vivo* em ratos

PG.PERIO
FORP-USP

Ribeirão Preto

2018

CRISTINE D'ALMEIDA BORGES

Avaliação da neoformação óssea após instalação de malhas de titânio e enxerto ósseo - análise histológica e microtomográfica *in vivo* em ratos

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Taba Jr.

Ribeirão Preto

2018

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

Ficha Catalográfica

Borges. Cristine D'Almeida Borges

Avaliação da neoformação óssea após instalação de malhas de titânio e enxerto ósseo - análise histológica e microtomográfica *in vivo* em ratos

112p. il., 30 cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Taba Jr. Mário Taba Jr.

1. regeneração óssea, 2. densidade óssea, 3. osso esponjoso.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cristine D'Almeida Borges

Avaliação da neoformação óssea após instalação de malhas de titânio e enxerto ósseo - análise histológica e microtomográfica *in vivo* em ratos

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor. Área de
concentração: Periodontia.

Aprovado em: ___/___/2018

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Celso e Virgínia, pela educação, amor e incentivo infinitos. Sempre serão meus exemplos de vida e sempre terei orgulho de tê-los como pais. Ao meu irmão, Afonso Jr., pelo apoio e amizade fortalecida, mesmo de longe.

Ao meu marido, Vagner, pelo apoio, amor e por tanto me apoiar durante o período de pós-graduação. À Carla e Bastos, novos pais que ganhei após o casamento.

Às minhas avós, Eliesete e Gabi (*in memoriam*), pelo exemplo de liderança familiar e incentivo, eternamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde e força de vontade para alcançar meus planejamentos, pela bela família que tenho e os melhores amigos que eu poderia ter.

Ao Prof Mário Taba Jr., pela orientação, paciência e confiança em meu trabalho. Pelos ensinamentos e incentivo no meu retorno para Maceió. Levarei comigo sempre. Muito obrigada.

Ao Prof. Paulo Faria, pela confiança, orientação e paciência durante o projeto, mesmo à distância.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Periodontia. Cada um com suas qualidades que servem de exemplo a ser alcançado na profissão.

Aos amigos da turma de pós-graduação, pela convivência e apoio por tantos anos. Em especial, Mariana e Paula, melhores amigas e irmãs que me fizeram esquecer de que estava longe de casa e, que hoje, me fazem muita falta.

À Monalisa, por toda a ajuda durante a parte experimental e análise microtomográfica. Sua calma e concentração me ajudaram muito em momentos de correria.

À Milla, técnica do Laboratório de Histologia, pela experiência e conversas durante o trabalho. Foram ótimos momentos na correria de laboratório.

Às secretárias do Departamento, Isabel, Dulce e Dani, pela educação e disposição mesmo à distância.

À funcionária da clínica, Dani, pela alegria na rotina de clínica e pelas palavras incentivadoras e todos os funcionários da FORP-USP.

Os anos de pós-graduação foram essenciais na minha formação como pessoa e professora. Tenho muito orgulho de ter sido formada nesta casa, a qual serei eternamente grata pela oportunidade.

RESUMO

Borges, C.D. **Avaliação da neoformação óssea após instalação de malhas de titânio e enxerto ósseo - análise histológica e microtomográfica *in vivo* em ratos.** Tese (Doutorado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Técnicas para reconstruções ósseas são descritas em artigos científicos e dentre as barreiras mecânicas utilizadas, a malha de titânio vem demonstrando possibilidades de tratamento para ganho ósseo. Estudos pré-clínicos são escassos na literatura relatando a melhor morfologia de malha de titânio a ser utilizada, além da necessidade de uso de membrana oclusiva adicional. Dessa forma, o objetivo do estudo é avaliar se há diferença na qualidade e volume ósseo formado ao utilizar malhas de titânio com diferentes diâmetros de poro, e avaliar a necessidade de utilização de uma membrana adicional, sobre a malha de titânio. Para este estudo foram utilizados 28 ratos adultos machos do tipo Wistar, com peso médio de 410,8 gramas. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais principais: Grupo P300: uso de malhas de titânio Painel Grade 15 Neodent®, com espessura de 0,3 mm e perfuração medindo 3 mm entre os vértices (n = 7); Grupo P175: uso de malhas de titânio Painel Grade 20 Neodent®, com espessura de 0,3 mm e perfuração com 1,75 mm diâmetro (n = 7); Grupo P85: uso de malhas de titânio Bionnovation® Surgitime Titânio, com espessura de 0,04 mm e perfuração com 0,85 mm de diâmetro (n = 7); Grupo P15: uso de malhas de titânio Bionnovation® Surgitime Titânio de espessura de 0,04 mm e perfuração com 0,15 mm de diâmetro (n = 7). Em todos os grupos, cada fêmur foi subdividido em teste (fêmur em que foi utilizado Bio-Oss Collagen® e membrana de colágeno BioGide®) e controle (apenas Bio-Oss Collagen®). Após 24 horas do procedimento cirúrgico, o qual foi realizado com anestesia geral, os animais foram submetidos a análise de microtomografia computadorizada *in vivo*, também sob anestesia. Após 30 dias, foram novamente submetidos a microtomografia computadorizada *in vivo* e, em seguida, eutanasiados para processamento histológico. Após análise estatística, foi observado que não houveram diferenças estatísticas em relação aos parâmetros volumétricos, nas comparações intra e entre grupos. Em relação a densidade mineral óssea, nas comparações intra grupos, relacionando fêmur teste e controle, não foram observadas significâncias estatísticas. Nas comparações entre grupos, foram observadas maior densidade nos grupos com maior diâmetro de perfuração ($p < 0,05$). Nas análises histológicas, foi possível observar neoformação óssea do tipo esponjosa, demonstrando o mesmo padrão em todos os grupos, com presença de osteócitos em lacuna, início de um processo de amadurecimento ósseo com formação de lamelas concêntricas e íntima relação do novo osso formado pelo enxerto e o fêmur. De acordo com os resultados pode-se concluir que, o diâmetro do poro da malha de diâmetro pode interferir na qualidade óssea, porém, irá depender do enxerto ósseo utilizado, e o uso adicional de membrana de colágeno, quando associada a enxerto ósseo, não determinou a formação de novo osso de qualidade superior.

Palavras-chave: regeneração óssea, densidade óssea, osso esponjoso.

ABSTRACT

Borges, C.D. **Evaluation of bone neof ormation after installation of titanium mesh and bone graft - histological and microtomographic analysis in vivo**

Techniques for bone reconstruction are described in scientific articles and, among mechanical barriers used, titanium mesh has been showing possibilities of treatment for bone gain. Preclinical studies are scarce in the literature reporting the best morphology of titanium mesh to be used, in addition to the need for additional occlusive membrane. Thus, the objective of this study is to evaluate if there is a difference in bone quality and volume formed when using titanium meshes with different pore diameters, and to evaluate the need to use an additional membrane on the titanium mesh. For this study, 28 male Wistar male rats with an average weight of 410.8 grams were used. The animals were randomly divided into four main experimental groups: Group P300: use of titanium meshes Grid Panel 15 Neodent®, with thickness of 0.3 mm and perforation measuring 3 mm between vertices (n = 7); Group P175: use of titanium meshes Grid Panel 20 Neodent®, with thickness of 0.3 mm and perforation with 1.75 mm diameter (n = 7); Group P85: use of titanium meshes Bionnovation® Surgitime Titanium, 0.04 mm thick and 0.85 mm diameter (n = 7); Group P15: use of titanium meshes Bionnovation® Surgitime Titanium thickness 0.04 mm and perforation with 0.15 mm diameter (n = 7). In all groups, each femur was subdivided into test (femur in which Bio-Oss Collagen® and BioGide® collagen membrane was used) and control (Bio-Oss Collagen® only). After 24 hours of the surgical procedure, which was performed under general anesthesia, the animals were submitted to in vivo microtomography, also under anesthesia. After 30 days, they were again submitted to computerized in vivo microtomography and then euthanized for histological processing. After statistical analysis, it was observed that there were no statistical differences in relation to the volumetric parameters, in intra and inter group comparisons. Regarding bone mineral density, in intragroup comparisons, relating femur test and control, no statistical significance was observed. In the comparisons between groups, higher densities were observed in the groups with greater drilling diameter (p <0.05). In the histological analyzes, it was possible to observe new bone formation of the spongy type, showing the same pattern in all groups, with presence of osteocytes in the gap, beginning of a bone ripening process with concentric lamella formation and an intimate relation of the new bone formed by the graft and the femur. According to the results, it can be concluded that the pore diameter of the diameter mesh may interfere with bone quality, however, it will depend on the bone graft used, and the additional use of collagen membrane, when associated with a bone graft, does not determined the formation of new bone of superior quality.

Keys words: bone regeneration, bone density, spongy bone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagens demonstrando a execução do procedimento cirúrgico.	25
Figura 2 – Imagem ilustrativa demonstrando a quantificação de osso formado na área do enxerto (Aumento original 2,5X).	30
Figura 3 – Imagem ilustrativa da medida de uma parte da interface enxerto/fêmur completa utilizando o programa Image J.....	31
Figura 4 – Volume tecidual (VT, mm ³) para todos os grupos e fêmures.....	34
Figura 5 – Volume Ósseo após 30 dias (VO, mm ³) para todos os grupos e fêmures.	35
Figura 6 – Relação entre volume ósseo (VO) e o volume total (VT) após 30 dias medidos em porcentagem, para todos os grupos e fêmures.	35
Figura 7 – Superfície de Intersecção (mm ²) após 30 dias, para todos os grupos e fêmures....	36
Figura 8 – Número de trabéculas (Tb.N) (1/mm) após 30 dias, para todos os grupos e fêmures.	36
Figura 9 – Espessura de trabéculas (Tb.Th) (mm) após 30 dias, para todos os grupos e fêmures.	37
Figura 10 – Espaço entre trabéculas (Tb.Sp) (mm) após 30 dias, para todos os grupos e fêmures.	37
Figura 11 – Porosidade total (%) após 30 dias, para todos os grupos e fêmures.	38
Figura 12 – Densidade Mineral Óssea (DMO) após 30 dias.....	39
Figura 13 – Reconstruções tridimensionais realizadas em microtomografia computadorizada in vivo do grupo P300 , fêmures teste e controle, baseline e 30 dias.	40
Figura 14 – Reconstruções tridimensionais realizadas em microtomografia computadorizada in vivo do grupo P175 , fêmures teste e controle, baseline e 30 dias.	40
Figura 15 – Reconstruções tridimensionais realizadas em microtomografia computadorizada in vivo do grupo P85 , fêmures teste e controle, baseline e 30 dias.	41
Figura 16 – Reconstruções tridimensionais realizadas em microtomografia computadorizada in vivo do grupo P15 , fêmures teste e controle, baseline e 30 dias.	41

Figura 17 – Exemplos de lâminas histológicas pertencentes ao Grupo P300, fêmur teste. .	43
Figura 18 – Exemplos de lâminas histológicas pertencentes ao Grupo P300, fêmur controle.	44
Figura 19 – Exemplos de lâminas histológicas pertencentes ao Grupo P175, fêmur teste. .	45
Figura 20 – Exemplos de lâminas histológicas pertencentes ao Grupo P175, fêmur controle.	46
Figura 21 – Exemplos de lâminas histológicas pertencentes ao Grupo P85, fêmur controle.	47
Figura 22 – Exemplos de lâminas histológicas pertencentes ao Grupo P85, fêmur teste. ...	48
Figura 23 – Exemplos de lâminas histológicas pertencentes ao Grupo P15, fêmur teste. ...	49
Figura 24 – Exemplos de lâminas histológicas pertencentes ao Grupo P15, fêmur controle.	50
Figura 25 – Porcentagem de áreas não mineralizadas (%).	51
Figura 26 – Porcentagem de interface BC/fêmur completa (%).	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias e desvios-padrão de parâmetros volumétricos (Volume Tecidual, Volume ósseo, VO/VT, Superfície de Intersecção) de todos os grupos e fêmures (Teste e Controle). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas análises intra e intergrupos ($p > 0,05$). Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$)..... 33

Tabela 2 – Médias e desvios-padrão de parâmetros volumétricos (Espessura de trabeculado, Número de trabéculas, Espaço entre trabéculas e Porosidade) de todos os grupos e fêmures (Teste e Controle). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas análises intra e intergrupos ($p > 0,05$). Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$)..... 34

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BC –	Bio-Oss Collagen
C –	Controle
cm –	centímetro
DMO –	Densidade mineral óssea
EDTA –	etilenodiamino tetra-acético
F –	fêmur
g/cm ³ –	Gramas por centímetros cúbicos
g –	Gramas
Kg –	quilogramas
Kv –	quilo volts
mg –	miligramas
ml –	mililitros
mm –	milímetros
mm ³ –	milímetros cúbicos
mm ² –	milímetros quadrados
mm ⁻¹ –	um por milímetros
PTFE –	Politetrafluoretileno
ROG –	Regeneração óssea guiada
ROI –	região de interesse
Rpm –	rotações por minuto
T –	Teste
Tb.Th –	espessura de trabeculado
Tb.N –	número de trabéculas
Tb.Sp –	espaço entre trabéculas
UNAERP –	Universidade de Ribeirão Preto

UI –	Unidade internacional
VOI –	volume de interesse
VT –	Volume tecidual
VO –	Volume ósseo
VO/VT –	Relação entre o volume ósseo e o volume total
β –	beta
μm –	micrômetro
μA –	micro ampere
% –	porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	14
2 PROPOSIÇÃO	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Aspectos éticos da pesquisa e apoio financeiro.....	22
3.2 Caracterização das amostras.....	22
3.2.1 Grupos experimentais.....	22
3.3 Procedimento cirúrgico.....	23
3.4 Microtomografia computadorizada <i>in vivo</i>	26
3.5 Processamento histológico	27
3.6 Análises histológicas	29
3.6.1 Análise descritiva	29
3.6.2 Caracterização do tipo ósseo	29
3.6.3 Medida da interface BC/fêmur	30
3.7 Análise dos resultados	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Medidas volumétricas.....	33
4.2 Análise histológica	42
4.2.1 Descrição histológica.....	42
4.3 Análise do tipo ósseo.....	51
4.4 Medida da interface BC/fêmur	52
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÕES.....	59
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO.....	67
ARTIGOS.....	69
ARTIGO 1	70
ARTIGO 2	92

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A perda dentária pode ser resultado de causas como trauma, cárie ou doença periodontal. Quando um dente é extraído, inevitavelmente ocorre perda óssea (Araujo and Lindhe 2005), podendo resultar em problemas estéticos, além de atrofia alveolar, a qual é caracterizada por moderada ou severa reabsorção alveolar devido a perda do elemento dentário (Atwood 1971). Estudos em animais e humanos comprovaram que após a perda dentária o processo alveolar sofre significativa reabsorção e perda de volume (Pietrokovski and Massler 1967, Araujo and Lindhe 2005). O reparo do alvéolo geralmente ocorre após 1-2 meses através de remodelação gradual que inclui alterações em espessura e altura, com redução de aproximadamente 40% de altura e 60% de espessura do osso alveolar (Araujo and Lindhe 2005).

Esse processo fisiológico de cicatrização é iniciado com o preenchimento do alvéolo pelo coágulo que, após maturação, forma a matriz de tecido conjuntivo, a qual eventualmente se torna mineralizada, primeiro em osso neoformado e depois em osso lamelar e medula óssea (Amler 1969, Cardaropoli, Araujo et al. 2003, Trombelli, Farina et al. 2008). O processo de reparo pode promover a perda do processo alveolar resultando na redução da crista óssea alveolar, tanto em dimensões verticais como horizontais, sendo mais evidente no componente horizontal (Pietrokovski and Massler 1967, Araujo and Lindhe 2005).

Técnicas para reconstruções ósseas são descritas em artigos científicos e têm o objetivo de ganhar o tecido ósseo que foi perdido durante o período de cicatrização fisiológico do alvéolo. A presença de um tecido ósseo em quantidade e qualidade é um dos grandes desafios atuais na Implantodontia. Dentre as técnicas disponíveis, os métodos mais comumente utilizados na prática clínica são os enxertos ósseos através da osteocondução e a regeneração óssea guiada (ROG). Osteocondução é o mecanismo em que o enxerto ósseo irá servir como mantenedor de espaço para permitir a formação do novo osso (Burchardt 1983). A ROG pelo qual uma barreira mecânica (membrana) é estrategicamente posicionada para impedir a rápida proliferação do epitélio e dos fibroblastos na região de interesse, permitindo que células osteoprogenitoras do defeito repovoem a área iniciando o processo de formação óssea (Hurley, Stinchfield et al. 1959, Dahlin, Linde et al. 1988, Hammerle and Karring 1998). É reconhecida como um método efetivo e previsível para garantir a formação óssea. Em muitos casos, a associação da ROG com enxertos ou substitutos ósseos é realizada, atuando no preenchimento de espaço e facilitando o processo de formação óssea (Artzi, Dayan et al. 2003).

Estudos comparando o tipo de membrana a ser utilizado estão difundidos na literatura desde os últimos 60 anos. A utilização de membranas oclusivas em associação com material

osteocondutor demonstrou ganho de tecido ósseo em vários estudos (Hammerle and Lang 2001, Zitzmann, Scharer et al. 2001, Zitzmann, Scharer et al. 2001, Strietzel, Khongkhunthian et al. 2006). As membranas absorvíveis, como por exemplo, mantêm uma barreira temporária, entre 6 a 8 semanas (Bunyaratavej and Wang 2001), e eliminam a necessidade de procedimento cirúrgico adicional para remoção. Porém, foi demonstrado que, membranas oclusivas sem reforço de titânio, feitas com materiais maleáveis, como por exemplo membranas de colágeno, apresentam tendência ao colapso em grandes reconstruções por não apresentar resistência adequada para manutenção de espaço (Rakhmatia, Ayukawa et al. 2014), o qual é essencial em reconstruções ósseas que objetivam o aumento vertical e horizontal do tecido ósseo (Hammerle and Jung 2003).

Dentre as barreiras mecânicas disponíveis no mercado, a malha de titânio vem ganhando espaço e demonstrando possibilidades de tratamento para ganho ósseo (Malchiodi, Scarano et al. 1998, Maiorana, Santoro et al. 2001, Artzi, Dayan et al. 2003, Proussaefs and Lozada 2006, Corinaldesi, Pieri et al. 2007, Longoni, Sartori et al. 2007). A técnica é baseada na ideia de que, o volume ósseo a ser criado pode ser planejado previamente ao procedimento cirúrgico e a malha pode ser moldada para manter o volume durante o período de cicatrização, sem que ocorra compressão do enxerto pelo retalho de tecido mole (Miyamoto, Funaki et al. 2012).

Até o presente momento, a barreira mecânica ideal para ROG permanece em estudos, com a intuição de apresentar fatores como, oclusividade para células indesejadas, estabilidade, diâmetro dos poros ideal, selamento periférico entre a barreira e o tecido ósseo, suprimento sanguíneo necessário e proporcionar proliferação de células osteoprogenitoras (Shin, Herr et al. 2013). Alguns estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram limitada regeneração óssea e infiltração de tecido mole quando membranas oclusivas não foram utilizadas sobre a malha de titânio, não seguindo, dessa forma, o conceito de ROG (Park, Lee et al. 2008, Her, Kang et al. 2012, Lim, Kim et al. 2015). O uso das malhas de titânio também apresenta desvantagens clínicas como o risco de exposição devido à deiscência de tecido mole, podendo gerar infecções e regeneração óssea incompleta. O risco de exposição pode ser aumentado em malhas mais rígidas pois, ao realizar a curvatura na tentativa de moldar o espaço que será mantido, as bordas podem apresentar-se cortantes, causando irritação mecânica no tecido mole do retalho (von Arx and Kurt 1998, Proussaefs and Lozada 2006). Técnicas cirúrgicas para a melhor manipulação do retalho são descritas na literatura e apresentam potencial de reduzir o risco de exposição.

Em relação a morfologia do biomaterial, dois critérios principais são necessários para se garantir bons resultados ao se utilizar uma barreira mecânica para ROG. O primeiro critério seria a manutenção do espaço pela barreira, impedindo o seu colapso e facilitando a transformação progressiva do coágulo em novo tecido ósseo. Alguns estudos demonstraram a importância da manutenção do espaço (von Arx and Kurt 1998, Brunel, Brocard et al. 2001, Maiorana, Santoro et al. 2001, Simion, Jovanovic et al. 2001, Rakhmatia, Ayukawa et al. 2014). A barreira também necessita ser maleável o suficiente para promover a geometria necessária para garantir o ganho ósseo em altura e espessura (Rakhmatia, Ayukawa et al. 2013). Materiais utilizados em membranas que não são reforçadas por titânio podem não apresentar o potencial de manter volume, gerando colapso e extravasamento do material para fora do defeito, quando comparado a malhas de titânio (Becker, Becker et al. 1996, Eisig, Ho et al. 2003, Rakhmatia, Ayukawa et al. 2014). Em malhas de titânio, essa manutenção de espaço está relacionada a rigidez e espessura do material. Autores sugerem que malhas de titânio com 50 μm de espessura apresentam tendência ao colapso porém, esse colapso é menor quando comparado com membranas sem reforço de titânio (Zellin and Linde 1996). O equilíbrio da espessura do material é essencial para garantir estabilidade, manutenção de espaço e maleabilidade de adaptação no defeito (von Arx and Kurt 1998).

O segundo critério importante nas barreiras mecânicas seria a porosidade do material ou oclusão dos poros, o qual poderia prevenir a invasão de tecido conjuntivo fibroso e sua interferência nas células osteoprogenitoras. Acredita-se que a presença dos poros permite que haja troca de nutrientes e oxigênio com o meio externo e melhore a qualidade do tecido ósseo neoformado. Porém, os poros também precisam ser impermeáveis a células epiteliais e fibroblastos (Bartee and Carr 1995).

No caso das malhas de titânio disponíveis comercialmente, muitas apresentam poros com diâmetros em escala de milímetros. Foi sugerido que a presença de poros com diâmetro maiores permite angiogênese no novo osso formado e melhor difusão de nutrientes. Por outro lado, poros de diâmetro menor ou malhas completamente oclusivas, podem limitar o processo de neovascularização, mas também restringir a invasão de tecido conjuntivo fibroso na área (Rakhmatia, Ayukawa et al. 2014). Foi sugerido que o crescimento ósseo ocorre em malhas com poro acima de 50 μm (Welsh, Pilliar et al. 1971).

Lim et al., utilizaram malha de titânio após instalação de implante imediato e, apesar da alta taxa de exposição, os autores não observaram regeneração óssea em muitas amostras, sugerindo o uso adicional de membrana oclusiva sobre a malha de titânio (Lim, Kim et al. 2015). A presença de uma camada de tecido mole abaixo da malha de titânio e a falta de

evidência de mineralização desse tecido mole, demonstra a possibilidade do uso da membrana oclusiva (Proussaefs and Lozada 2006, Louis, Gutta et al. 2008, Her, Kang et al. 2012). Apesar da necessidade da utilização de uma barreira mecânica para a obtenção dos critérios da ROG, bons resultados foram demonstrados através da utilização de malhas de titânio com diferentes diâmetros de poros (Zellin and Linde 1996, Lundgren, Sennerby et al. 1998, Dupoirieux, Pourquier et al. 2001, Artzi, Dayan et al. 2003, Proussaefs and Lozada 2006, Miyamoto, Funaki et al. 2012, Rakhmatia, Ayukawa et al. 2014), o que demonstra que os resultados ainda não são conclusivos.

Estudos pré-clínicos demonstram resultados favoráveis. Rakhmatia et al. (2014) realizaram um estudo em calvária de rato comparando espessura e porosidade de diferentes malhas de titânio, membrana de colágeno e membrana de PTFE. Os autores observaram que a espessura e porosidade do material são importantes na ROG, principalmente em estágios iniciais da cicatrização. Além disso, malhas de titânio com espessura de 100 μ m e poros com maior diâmetro demonstraram melhores resultados. Em relação a membrana de colágeno e PTFE, foi sugerido que as mesmas apresentam tendência ao colapso, sendo indicado o uso de enxerto ósseo para a manutenção do espaço (Rakhmatia, Ayukawa et al. 2014). Outros autores objetivaram avaliar a necessidade de uso do enxerto ósseo de hidroxiapatita associado a malha de titânio para ROG, em cães. Observaram que, apesar das limitações devido a quantidade de deiscências ocorridas, foi possível verificar o benefício em utilizar o enxerto ósseo para manutenção de espaço e volume (Eisig, Ho et al. 2003).

Em um estudo clínico controlado randomizado, foi comparado o uso de membrana de PTFE com reforço de titânio e malha de titânio associada a membrana de colágeno. Os dois materiais foram associados com uma mistura de 50% de enxerto ósseo alógeno e 50% de enxerto autógeno. Os autores concluíram que os dois métodos apresentaram resultados semelhantes em relação ao volume e formação óssea, mesmo a malha de titânio apresentando maior exposição do retalho (Cucchi, Vignudelli et al. 2017).

Dessa forma, considerando a escassez de estudos pré-clínicos, o objetivo do estudo é avaliar se há diferença na qualidade e volume ósseo formado ao utilizar malhas de titânio com diferentes espessuras e diâmetros de poro. Além disso, avaliar a necessidade de utilização de uma membrana adicional, sobre a malha de titânio, com o objetivo de impedir a migração de células epiteliais e fibroblastos.

2 PROPOSIÇÃO

Geral

Este estudo tem como objetivo avaliar a neoformação óssea após ROG com quatro diferentes malhas de titânio através de análises histológicas e de microtomografia computadorizada in vivo.

Específicos

- Avaliar se há diferença na qualidade e volume ósseo após uso de malhas de titânio de espessuras diferentes, de forma histológica e microtomográfica in vivo;
- Avaliar se há diferença na qualidade e volume ósseo após uso de malhas de titânio com poros de diferentes diâmetros, de forma histológica e microtomográfica in vivo;
- Avaliar se há diferença na qualidade e volume ósseo na presença ou ausência de membrana de colágeno sobre a malha de titânio, de forma histológica e microtomográfica in vivo;
- Avaliar a qualidade e volume ósseo após uso de enxerto ósseo bovino associado a colágeno suíno sob a malha de titânio, na presença ou na ausência de membrana de colágeno, de forma histológica e microtomográfica in vivo;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos da pesquisa e apoio financeiro

Inicialmente, o projeto desta pesquisa foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto (CEP/UNAERP), o qual foi devidamente aprovado e registrado através do código ComÉEt:15/2015. O projeto teve auxílio financeiro através de doação de biomateriais utilizados durante o estudo, das seguintes empresas: Neodent¹, Geistlich² e Bionnovation³.

3.2 Caracterização das amostras

Para este estudo foram utilizados 28 ratos adultos machos do tipo Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com peso médio de 410,8 gramas, provenientes do biotério central da UNAERP. Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas com alimento e água *ad libitum* antes e durante o período experimental, e permaneceram no Biotério da UNAERP em ambiente com ciclo de 12 horas de luz e temperatura entre 22 e 24°C. Os biomateriais utilizados no estudo foram instalados nos dois fêmures de cada animal através de procedimento cirúrgico padronizado. Todas as etapas cirúrgicas foram realizadas no Biotério da UNAERP.

3.2.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais principais, de acordo com a utilização de diferentes malhas de titânio:

- Grupo P300: animais em que foram utilizadas as malhas de titânio Painel Grade 15 Neodent®, com espessura de 0,3 mm e perfuração em formato de losango, medindo 3 mm entre os vértices (n = 7);
- Grupo P175: animais em que foram utilizadas as malhas de titânio Painel Grade 20 Neodent®, com espessura de 0,3 mm e perfuração em formato circular com 1,75 mm diâmetro (n = 7).
- Grupo P85: animais em que foram utilizadas as malhas de titânio Bionnovation® Surgitime Titânio, com espessura de 0,04 mm e perfuração em formato circular com 0,85 mm de diâmetro (n = 7);

¹ Neodent®, Curitiba, PR, Brasil

² Geistlich® Pharma, São Paulo, SP, Brasil

³ Bionnovation® Biomedical, Bauru, SP, Brasil

- Grupo P15: animais em que foram utilizadas as malhas de titânio Bionnovation® Surgitime Titânio de espessura de 0,04 mm e perfuração em formato circular com 0,15 mm de diâmetro (n = 7).

Em todos os grupos, cada fêmur foi subdividido em teste e controle:

- Teste (T): fêmur em que foi utilizado enxerto ósseo bovino anorgânico associado a colágeno suíno⁴ (BC) e membrana de colágeno⁵.
- Controle (C): fêmur em que foi utilizado apenas enxerto ósseo bovino anorgânico associado a colágeno suíno.

Para a determinação do uso da membrana de colágeno, os fêmures direito e esquerdo de cada animal foram aleatorizados com o auxílio do programa Microsoft Excel 14.0.7⁶. A aleatorização apenas foi revelada para o operador (Borges, CD) após a abertura da ferida cirúrgica e visualização completa do fêmur.

3.3 Procedimento cirúrgico

Os animais foram primeiramente pesados para o correto cálculo anestésico. A anestesia geral foi obtida pela associação de 0.08 ml/100g de Cloridrato de Ketamina⁷ e 0.04 ml/100g de Cloridrato de Xilazina⁸ por injeção via intramuscular. Posteriormente, foi realizada a tricotomia com cortador elétrico e, em seguida, a assepsia local, utilizando uma solução de clorexidina a 2%.

A incisão inicial foi realizada paralela ao longo eixo do fêmur, na porção externa da coxa, nas pernas direita e esquerda dos animais, utilizando um cabo de bisturi n° 3, montado com lâmina de bisturi n° 15⁹ (Figura 1A). O local de eleição da incisão foi estabelecido pela porção mais volumosa do tecido ósseo, através da palpação. O tecido muscular foi divulsionado até a completa exposição do periósteo. O descolamento do periósteo foi realizado utilizando o descoladores de Freer e de Molt. Os mesmos instrumentos auxiliaram no afastamento do retalho e estabilização do fêmur.

⁴ Bio-Oss Collagen Geistlich® Pharma, São Paulo, SP, Brasil

⁵ Bio-Gide Geistlich® Pharma, São Paulo, SP, Brasil

⁶ Microsoft® Corporation, Santa Rosa, Califórnia

⁷ Agener União Ltda, São Paulo, SP, Brasil

⁸ Rompum; Bayer AS, São Paulo, SP, Brasil

⁹ Swann-Morton, Sheffield, Inglaterra

Após completa visualização do tecido ósseo do fêmur, foram realizadas três perfurações com broca 1.3¹⁰ acoplada em contra ângulo de 20:1¹¹ e velocidade de 500 rpm sob irrigação com soro fisiológico (Figura 1B, C). As perfurações não atingiram a medula óssea, para não aumentar o risco de fratura do fêmur, e foram realizadas com o objetivo de delimitar a área do enxerto. Em seguida, cada bloco de BC foi dividido igualmente em quatro amostras. Cada amostra foi mantida em soro fisiológico em pote dappen para que o enxerto absorvesse a solução e permitisse o amaciamento das fibras do enxerto, facilitando a adaptação.

A amostra de enxerto preparada foi então posicionada sobre as perfurações e a malha de titânio foi posicionada e fixada com dois parafusos gengivais de 5 mm de altura e 1,6 mm de diâmetro¹². Nos grupos P300 e P175, os parafusos foram posicionados em lados opostos do fêmur (Figura 1D, F). Nos grupos P85 e P15, os parafusos foram posicionados apenas na parte superior do fêmur (Figura 1E, G). Os parafusos foram posicionados com auxílio de chave de mão ou contra ângulo em rotação de 20 rpm. Seguindo a ordem de aleatorização dos fêmures, a membrana de colágeno de 10 mm x 15 mm foi posicionada sobre a malha de titânio apenas no fêmur teste (Figura 1H). As etapas da fase cirúrgica foram repetidas em cada fêmur de acordo com o protocolo estabelecido. O ato operatório foi finalizado com o fechamento primário dos tecidos por meio de suturas por planos, utilizando fios de sutura absorvíveis¹³.

Após a cirurgia, os animais receberam uma dose única de antibiótico via intramuscular de 24.000 UI/kg de Penicilina G-benzatina¹⁴ na dose de 0,01 ml para cada 100g do peso corpóreo do rato e dipirona sódica 500mg¹⁵, 30 gotas diluídas em 500 ml de água que ficava à disposição do animal durante o pós-operatório. Nenhuma restrição de movimentação ou alimentação foi feita aos animais após a cirurgia. Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, os animais foram novamente anestesiados, utilizando a mesma técnica de anestesia informada anteriormente. Em seguida, cada animal foi posicionado para análise em microtomógrafo *in vivo*, determinando assim a análise *baseline* da microtomografia computadorizada. Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas durante todo o período experimental de 30 dias. No 30º dia, os animais foram novamente anestesiados e submetidos a nova análise em microtomógrafo *in vivo*, determinando a análise de 30 dias. Ao

¹⁰ Kit de enxerto ósseo Neodent®, Curitiba, PR, Brasil

¹¹ Contra ângulo Konzept - Kavo®, Joinville, SC, Brasil

¹² Parafuso gengival Neodent®, Curitiba, PR, Brasil

¹³ Vicryl Ethicon 5.0, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil

¹⁴ Pentabiótico veterinário pequeno porte, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP

¹⁵ D-500, uso veterinário, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP

final da análise em microtomógrafo in vivo, os animais foram eutanasiados com aprofundamento anestésico de 150 mg/kg de tiopentato de sódio 2.5%¹⁶, via intraperitoneal.

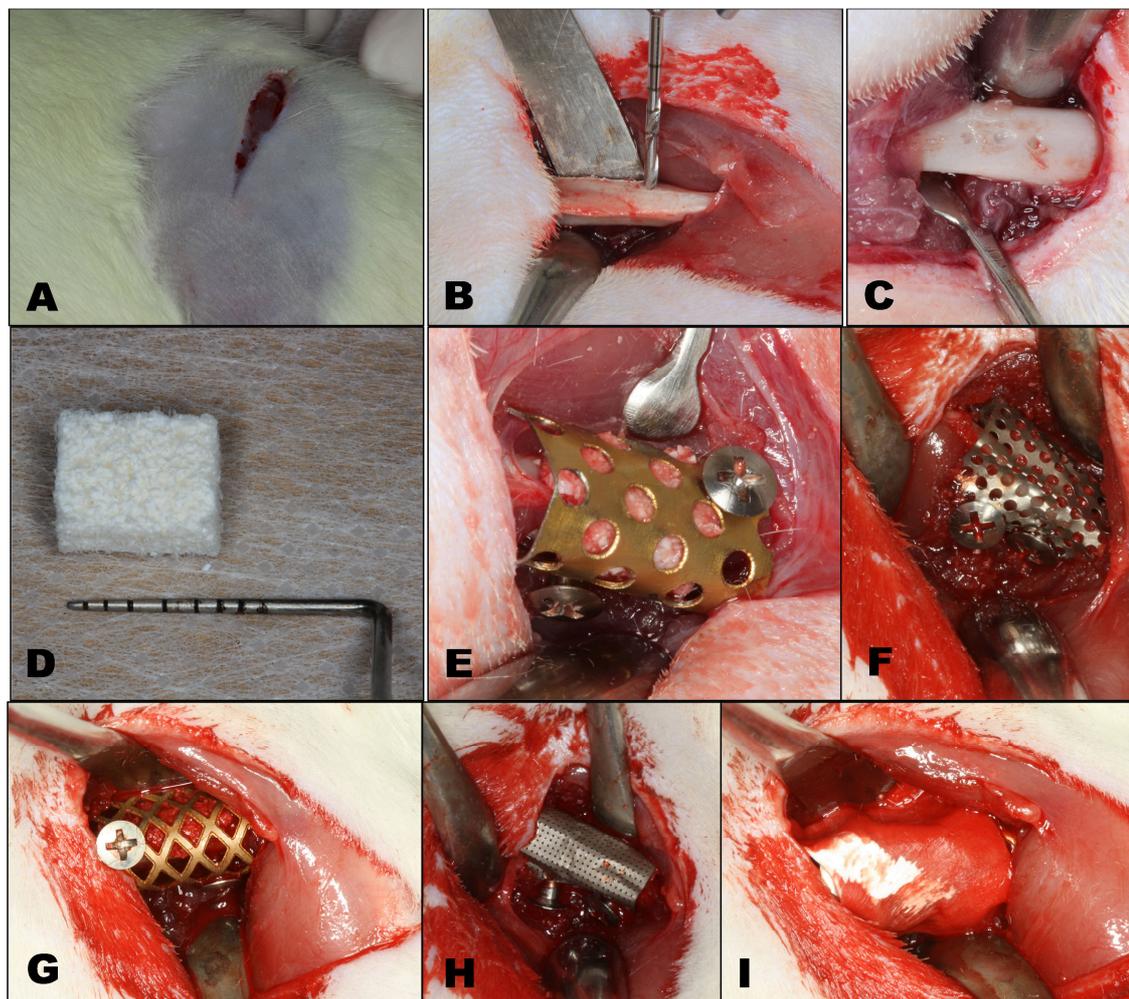


Figura 1 – Imagens demonstrando a execução do procedimento cirúrgico. **A** – incisão inicial; **B** - Afastamento dos tecidos para completa visualização do fêmur e posicionamento da broca 1.3 para a realização das perfurações; **C** – Visualização das perfurações; **D** – Enxerto ósseo BC; **E** – Malha de titânio do grupo P175 posicionada e fixada com dois parafusos gengivais; **F** - Malha de titânio do grupo P85 posicionada e fixada com dois parafusos gengivais; **G** - Malha de titânio do grupo P300 posicionada e fixada com dois parafusos gengivais; **H** - Malha de titânio do grupo P15 posicionada e fixada com dois parafusos gengivais; **I** – Membrana de colágeno posicionada sobre a malha de titânio (imagem ilustrativa; membrana posicionada em todos fêmures teste).

¹⁶ Thiopentax, Cristália, Brasil

3.4 Microtomografia computadorizada *in vivo*

A tomografia computadorizada é uma técnica que permite a visualização de secções transversais de um objeto. O princípio do funcionamento do microtomógrafo de raio-x baseia-se na propriedade dos materiais absorverem esta radiação de forma diferenciada dependendo de sua composição química e densidade. A análise divide virtualmente o objeto de estudo em “fatias” transversais nas quais são mapeados parâmetros físicos como a densidade e a porosidade de cada região interna do objeto. A união de todas as “fatias” gera uma imagem com representação 3D, a qual foi utilizada para as análises volumétricas.

Para aquisição das imagens, foi utilizado o Microtomógrafo SkyScan modelo 1176¹⁷. O aparelho é composto por um tubo de Raios-X de microfoco com fonte de alta tensão (65 kV, 382 μ A), resolução de 18 μ m, com filtro de coopeer aluminum, rotation step (0,7/360°) + câmera off set 2x e frame de 1. Todo este sistema está conectado a um computador Dell Precision R7610 WorkStation¹⁸, com sistema operacional Windows 7 a 64 bits, utilizado no controle, aquisição de dados, construção e análise dos atributos das imagens. Para os parâmetros de reconstrução, foram utilizados smophing (0), op. Lg. 0; B. 0% e log. 0.006 a 0.045.

Foram realizadas análises microtomográficas da microarquitetura tridimensional do enxerto e do osso neoformado. Para o processamento das imagens foi utilizado o Software de Reconstrução - NRecon v.1.6.9, Software de análise - DataViewer versão 1.4.1 e CTAn v.1.14.4, Software de navegação em 3D – CTVol v.2.2.

A análise de microtomografia computadorizada *in vivo* foi realizada 24 horas (*baseline*) e 30 dias após o procedimento cirúrgico, sob anestesia, utilizando a mesma técnica anestésica descrita no procedimento cirúrgico. O objetivo de realizar a análise em *baseline in vivo* foi para capturar o volume inicial do enxerto ósseo posicionado abaixo da malha de titânio e servir de referência para comparações com as análises de formação óssea final. Todas as medições foram realizadas por um examinador cego.

A região de interesse (ROI) teve como referência a malha de titânio e os parafusos gengivais que fixaram a malha em posição. Sendo assim, o ROI é a área selecionada abaixo da malha de titânio e de secção transversal (enxerto ou tecido ósseo neoformado). O volume de interesse (VOI) foi obtido através da soma de todos os ROIs coletivos sobre um conjunto contíguo de fatias de imagem de secção transversal, representando um volume 3D

¹⁷ Bruker-microCT, SkyScan, Kontich, Bélgica

¹⁸ Dell Inc., São Paulo, SP, Brasil

selecionado. Dessa forma, as medidas volumétricas foram realizadas em um VOI e foram determinadas de acordo com as definições a seguir:

- Medida volumétrica no Baseline
 - Volume tecidual (VT, mm^3) - A medidas indicam o volume total de interesse na região entre a malha de titânio e os parafusos gengivais, correspondente ao enxerto ósseo utilizado.
- Medidas volumétricas em 30 dias
 - Volume tecidual (VO, mm^3) – A medida indica o volume total de interesse na região entre a malha de titânio e os parafusos gengivais.
 - Volume ósseo (mm^3) – A medida indica o volume total binarizado dentro do VOI. A binarização é o procedimento utilizado pelo programa de análise para diferenciar osso do restante do tecido não ósseo.
 - Relação entre o volume ósseo e o volume total (VO/VT, %) – É a medida em porcentagem que indica a proporção do VOI ocupado por osso.
 - Superfície de intersecção (mm^2) – A medida indica a superfície do VOI entrecortado por objetos binarizados sólidos, ou seja, a parte da superfície do VOI na qual as partículas ósseas se cruzam, na interface do trabeculado ósseo.
 - Espessura de trabeculado (Tb.Th, mm) – A medida indica a espessura trabecular óssea. Esta medida é importante para caracterizar a forma de uma estrutura complexa, como o osso trabecular.
 - Número de trabéculas (Tb.N, mm^{-1}) – O número trabecular, também chamado de estrutura de densidade linear, é o número de transversais através de uma estrutura trabecular feito por unidade de comprimento em um caminho linear aleatório através do VOI.
 - Espaço entre trabéculas (Tb.Sp, mm) – A medida indica a separação trabecular que é essencialmente a espessura dos espaços definidos pela binarização dentro do VOI.
 - Porosidade (%) – A medida indica o volume de todos os poros, abertos e fechados, como uma porcentagem do volume total do VOI.
 - Densidade mineral óssea (DMO, g/cm^3) – A medida refere-se à quantidade de minerais encontrada nos ossos.

3.5 Processamento histológico

Após a eutanásia, os fêmures direito e esquerdo foram fixados em formol neutro a 10% por 48 horas. O preparo das peças foi realizado no Laboratório de Histologia de

Departamento de Cirurgia Bucomaxilofacial e Periodontia da Faculdade de Ribeirão Preto (FORP-USP). A descalcificação foi realizada por meio de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético¹⁹ (EDTA) a 10% e pH = 7,0, com trocas de duas a três vezes por semana, por um período médio de 60 dias, até a completa descalcificação das peças. Durante a descalcificação, as peças foram armazenadas individualmente em cassetes plásticos, devidamente identificados, e mantidas totalmente imersas em EDTA.

Após a descalcificação, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas. Em cada peça, o parafuso e a malha de titânio foram removidos, sem danificar os tecidos circunvizinhos. Utilizando as perfurações dos parafusos como referência, as peças foram divididas em duas partes, no sentido transversal, na distância central entre as perfurações, utilizando lâmina de bisturi 15 e pinça clínica.

Em seguida, foi iniciado o processo de desidratação das peças, através de banhos sucessivos em séries crescentes de álcoois²⁰ em concentração 70%, 80%, 90%, 95% e 100%, sucessivamente, na temperatura ambiente por 60 minutos em cada concentração, com exceção do banho em álcool 90% que permaneceu por 12 horas. Na sequência, as peças permaneceram por 15 minutos em solução de 50% de álcool 100% e 50% de xilol²¹. As peças foram então diafanizadas em xilol, em dois banhos de aproximadamente 45 e 30 minutos, respectivamente, removendo todo o álcool e permitindo condições para que a peça seja impregnada por parafina.

Após finalização da desidratação e diafanização, as peças foram incluídas em parafina fundida a 56° C, dentro de uma estufa com temperatura controlada, e três processos de uma hora cada. As peças foram centralizadas em formas padronizadas para posterior solidificação. Secções seriadas de 5 µm de espessura foram obtidas do ponto mais central da área do enxerto, no sentido transversal, utilizando micrótomo eletrônico²², e dispostas em lâminas silanizadas para microscopia.

Para a coloração das lâminas, foi utilizada a técnica de Hematoxilina de Harris e Tricrômico de Mason. O processo foi iniciado com três banhos sequentes e individuais de xilol e álcool, seguidos de banhos em água corrente. Em sequência as lâminas permaneceram por 5 minutos em coloração hematoxilina, seguidas de banho em água corrente e coloração de Tricrômico de Masson por 20 minutos. Após finalizar a lavagem em água corrente, o processo foi finalizado com quatro banhos sequentes de álcoois e três banhos de xilol, totalizando 82 minutos para o processo completo. A montagem das lâminas foi finalizada com lamínulas de vidro.

¹⁹ EDTA (Sal dissódico), Dinâmica® Química Contemporânea Ltda, Diadema, SP, Brasil.

²⁰ Álcool, Synth, Diadema, SP, Brasil.

²¹ Xilol, Symth, Diadema, SP, Brasil

²² Microm HM 335E, SA®, Alemanha.

3.6 Análises histológicas

Os cortes foram analisados em microscopia de luz para avaliação de qualidade óssea. As imagens foram capturadas através de uma câmara de vídeo Leica DC 300F²³ acoplada a um estereomicroscópio Leica MZFL III²⁴.

3.6.1 Análise descritiva

De forma descritiva, o padrão celular e o biomaterial remanescente foi avaliado no intuito de facilitar a caracterização da biologia do novo formado. Os critérios morfológicos utilizados para identificar os tipos celulares avaliados foram:

Osteoblastos: células ósseas dispostas na superfície óssea/enxerto, alinhadas, num arranjo que lembra o epitélio simples. Em intensa atividade sintética mostram-se cuboides e com citoplasma basófilo e em estado pouco ativos são achatados e apresentam fraca basofilia citoplasmática.

Osteócitos: células ósseas presentes nas lacunas no interior da matriz óssea.

Osteoclastos: células ósseas multinucleadas responsáveis pela reabsorção da matriz óssea mineralizada e desmineralizada.

Biomaterial remanescente: caracterizado pela presença de lacunas no interior da matriz óssea, porém, sem conteúdo celular, ou pela presença do cristal do enxerto visivelmente intacto e circundado por matriz óssea.

Amadurecimento das fibras colágenas: A intensidade do brilho de birrefringência sob luz polarizada é proporcional à organização e amadurecimento das fibras colágenas, caracterizando a anisotropia óssea.

3.6.2 Caracterização do tipo ósseo

A definição do tipo ósseo foi determinada através da análise de uma imagem de cada fêmur, capturada com objetiva de 2,5X de aumento. Para a quantificação de osso formado, foi utilizada uma grade padronizada em computador, medindo 2 cm X 2 cm e contendo seis colunas e seis linhas. A presença de formação óssea foi determinada através da porcentagem de pontos de intersecção entre as linhas horizontais e verticais. A mensuração foi feita em três

²³ Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Alemanha

²⁴ Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Alemanha

pontos da área total enxertada: nas duas extremidades e no ponto mais central da área (Figura 2). A porcentagem final foi determinada como a média dos três pontos.

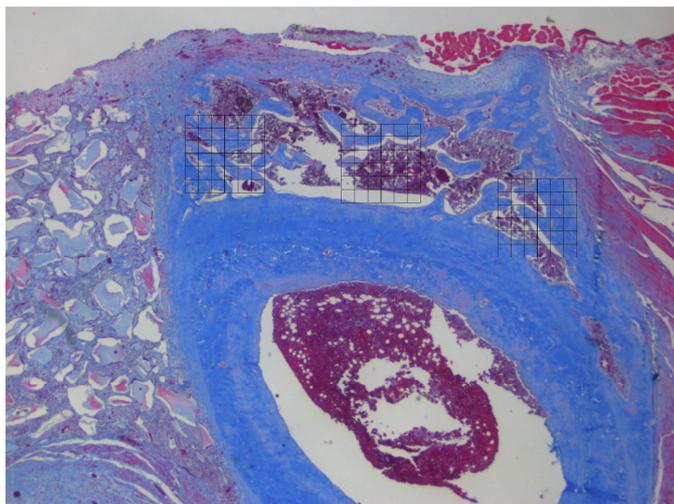


Figura 2 – Imagem ilustrativa demonstrando a quantificação de osso formado na área do enxerto (Aumento original 2,5X).

3.6.3 Medida da interface BC/fêmur

Através de uma imagem capturada com a objetiva de 10X de aumento, a interface enxerto/fêmur foi medida na região central da área enxertada, a qual foi considerada como representativa. Para isso, foi utilizado o programa Image J²⁵.

Inicialmente, a medição em linha reta foi padronizada no programa, utilizando uma régua proveniente do programa do microscópio, referente a objetiva da imagem utilizada, no caso a objetiva de 10X. Em seguida as medidas foram realizadas, como demonstra a Figura 3, e transformadas em porcentagem de interface BC/fêmur completa.

²⁵ Image J 1.36b, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, EUA

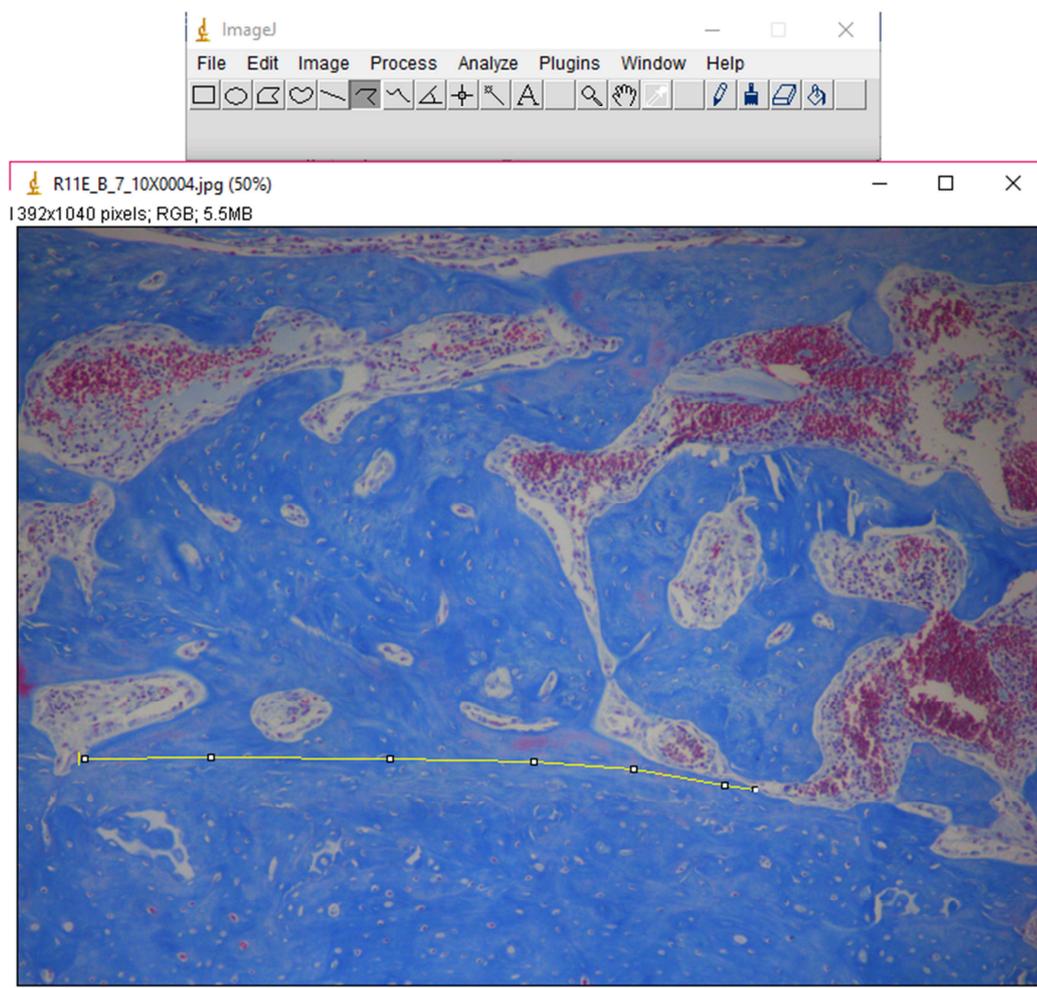


Figura 3 – Imagem ilustrativa da medida de uma parte da interface enxerto/fêmur completa utilizando o programa Image J.

3.7 Análise dos resultados

A hipótese de não haver diferença estatisticamente significativa na qualidade do novo osso formado, em relação ao uso de diferentes malhas de titânio, além da presença ou ausência de membrana de colágeno, foi testada. A análise estatística foi realizada com o programa de estatística GraphPad Prism versão 7²⁶.

Foi verificada a normalidade dos dados obtidos. Os dados microtomográficos e as medidas histológicas de tipo ósseo e interface enxerto/fêmur foram comparados entre e intragrupos através do teste ANOVA dois critérios, com pós teste Tukey. Para todas as análises estatísticas foi utilizado um nível de significância de 5%.

²⁶ Graphpad Software Inc., San Diego, CA

4 RESULTADOS

A parte experimental envolvendo o procedimento cirúrgico transcorreu com algumas intercorrências. O grupo P175 e P85 apresentaram perda de 2 animais em cada. O grupo P15 apresentou perda de 1 animal, totalizando 23 animais no experimento. Os animais excluídos foram eutanasiados por apresentarem fratura ou por se apresentarem debilitados durante o período de cicatrização.

Dessa forma, os grupos experimentais principais apresentaram número amostral como: P300 – N = 7; P175 – N = 5; P85 – N = 5; P15 – N = 6.

4.1 Medidas volumétricas

Para uma melhor compressão dos resultados, os valores numéricos foram distribuídos em tabelas e para facilitar a visualização, foram confeccionados gráficos para cada parâmetro tridimensional avaliado.

As tabelas contêm os grupos (P300, P175, P85 e P15) com seus respectivos fêmures T e C. Na análise do parâmetro de volume, foram utilizados dados iniciais (baseline) e finais (30 dias). Para os demais parâmetros, foram utilizados apenas os dados finais, relativos ao tecido ósseo formado.

Tabela 1 – Médias e desvios-padrão de parâmetros volumétricos (Volume Tecidual, Volume ósseo, VO/VT, Superfície de Intersecção) de todos os grupos e fêmures (Teste e Controle). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas análises intra e intergrupos ($p > 0,05$). Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$).

GRUPOS		Volume Tecidual (VT, mm ³)	Volume Ósseo (VO, mm ³)	VO/VT (%)	Superfície de Intersecção (mm ²)
GRUPO P300	TESTE	125,53 ± 24,85	27,22 ± 5,28	21,95 ± 3,91	82,28 ± 24,27
	CONTROLE	135,91 ± 27,77	35,95 ± 7,84	26,77 ± 4,57	95,29 ± 20,16
GRUPO P175	TESTE	112,3 ± 28,32	32,58 ± 13,12	30,45 ± 14,20	109,58 ± 52,38
	CONTROLE	121,39 ± 15,22	33,70 ± 16,46	27,54 ± 11,26	108,18 ± 41,77
GRUPO P85	TESTE	120,10 ± 38,32	21,48 ± 5,85	18,27 ± 3,89	63,95 ± 12,14
	CONTROLE	124,81 ± 29,16	26,41 ± 9,92	22,26 ± 9,64	68,53 ± 19,28
GRUPO P15	TESTE	84,06 ± 34,19	22,8 ± 9,02	27,24 ± 5,09	75,05 ± 29,54
	CONTROLE	87,95 ± 21,94	25,87 ± 8,15	30,85 ± 12,33	78,85 ± 21,66

Tabela 2 – Médias e desvios-padrão de parâmetros volumétricos (Espessura de trabeculado, Número de trabéculas, Espaço entre trabéculas e Porosidade) de todos os grupos e fêmures (Teste e Controle). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas análises intra e intergrupos ($p>0,05$). Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p<0,05$).

GRUPOS		Espessura de Trabeculado (mm)	Número de Trabéculas (mm^{-1})	Espaço entre trabéculas (mm)	Porosidade (%)
GRUPO P300	TESTE	0,15 ± 0,03	1,5 ± 0,25	0,45 ± 0,09	78,05 ± 3,91
	CONTROLE	0,16 ± 0,02	1,7 ± 0,32	0,45 ± 0,09	73,23 ± 4,57
GRUPO P175	TESTE	0,17 ± 0,05	1,73 ± 0,36	0,44 ± 0,08	69,55 ± 14,2
	CONTROLE	0,16 ± 0,04	1,62 ± 0,31	0,45 ± 0,09	72,46 ± 11,26
GRUPO P85	TESTE	0,12 ± 0,0	1,55 ± 0,34	0,42 ± 0,14	81,73 ± 3,89
	CONTROLE	0,12 ± 0,01	1,88 ± 0,8	0,4 ± 0,22	77,74 ± 9,64
GRUPO P15	TESTE	0,14 ± 0,01	1,92 ± 0,27	0,34 ± 0,06	72,76 ± 5,09
	CONTROLE	0,15 ± 0,03	1,95 ± 0,52	0,35 ± 0,08	69,15 ± 12,33

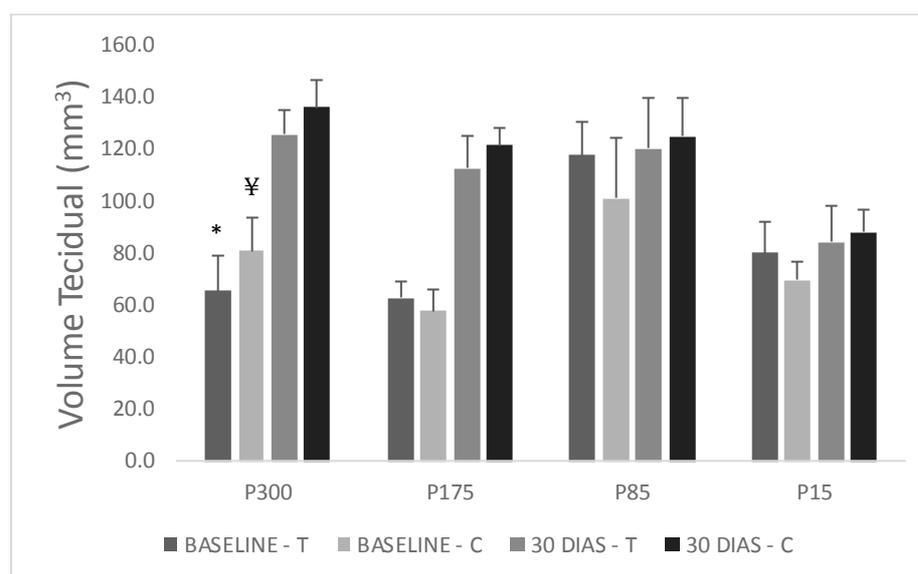


Figura 4 – Volume tecidual (VT, mm^3) para todos os grupos e fêmures. Foram observadas diferenças significativas entre P300 baseline e 30 dias, tanto teste quanto controle (Anova, Tukey, $p<0,05$). Nos demais grupos, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$). As barras representam médias e erros positivos. Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey). T: Teste; C: Controle. O resultado demonstra que todos os grupos mantiveram o volume tecidual em relação ao enxerto ósseo posicionado. Porém, apenas P300 demonstrou diferença significativa após 30 dias.

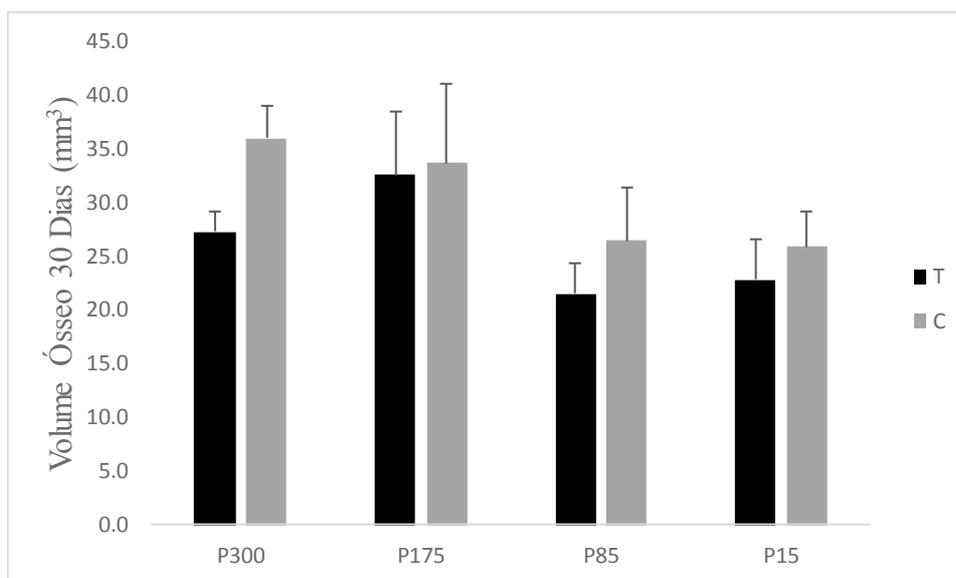


Figura 5 – Volume Ósseo após 30 dias (VO, mm³) para todos os grupos e fêmures. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas análises intra e intergrupos ($p > 0,05$). As barras representam médias e erros positivos. Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). T: Teste; C: Controle. Observa-se que, mesmo com volume tecidual numericamente maior, as malhas dos grupos P300 e P175 demonstraram volume ósseo semelhante aos grupos P85 e P15.

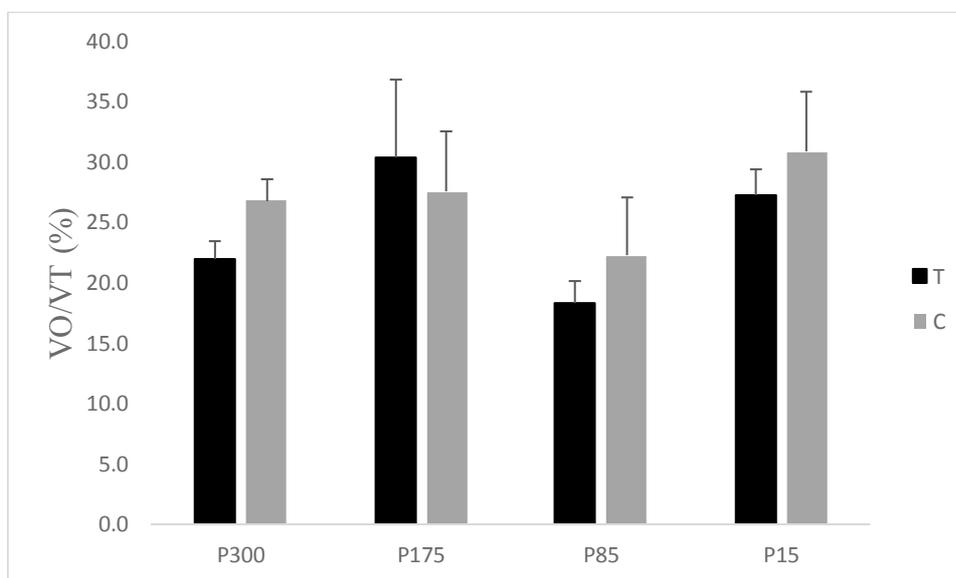


Figura 6 – Relação entre volume ósseo (VO) e o volume total (VT) após 30 dias medidos em porcentagem, para todos os grupos e fêmures. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas análises intra e intergrupos ($p > 0,05$). As barras representam médias e erros positivos (%). Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). T: Teste; C: Controle.

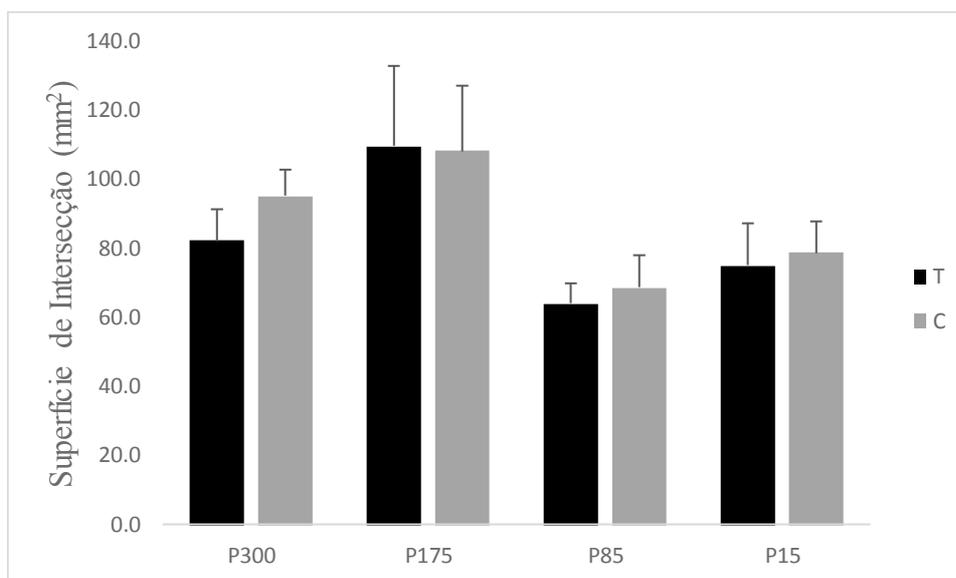


Figura 7 – Superfície de Intersecção (mm²) após 30 dias, para todos os grupos e fêmures. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas análises intra e intergrupos ($p > 0,05$). As barras representam médias e erros positivos. Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). T: Teste; C: Controle.

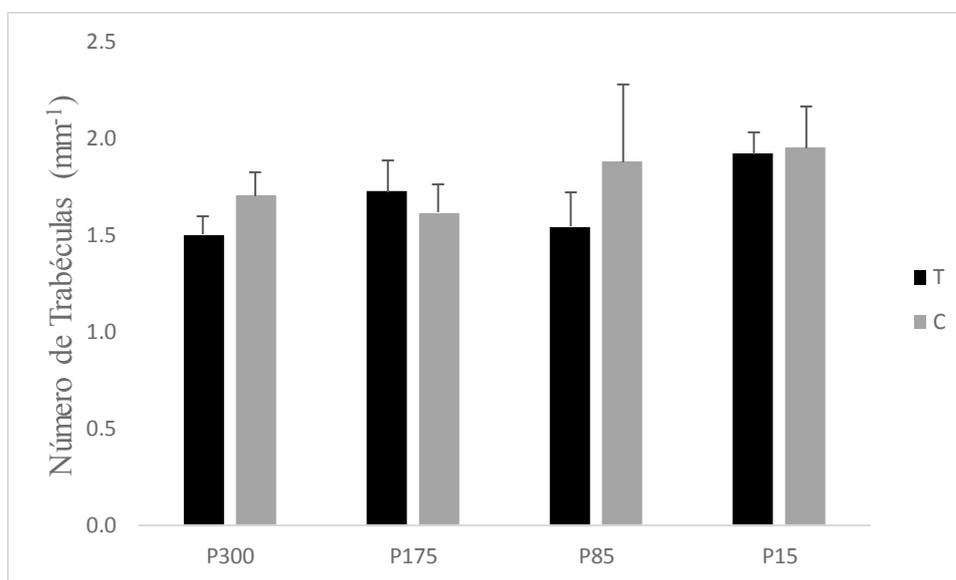


Figura 8 – Número de trabéculas (Tb.N) (1/mm) após 30 dias, para todos os grupos e fêmures. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas análises intra e intergrupos ($p > 0,05$). As barras representam médias e erros positivos. Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). T: Teste; C: Controle.

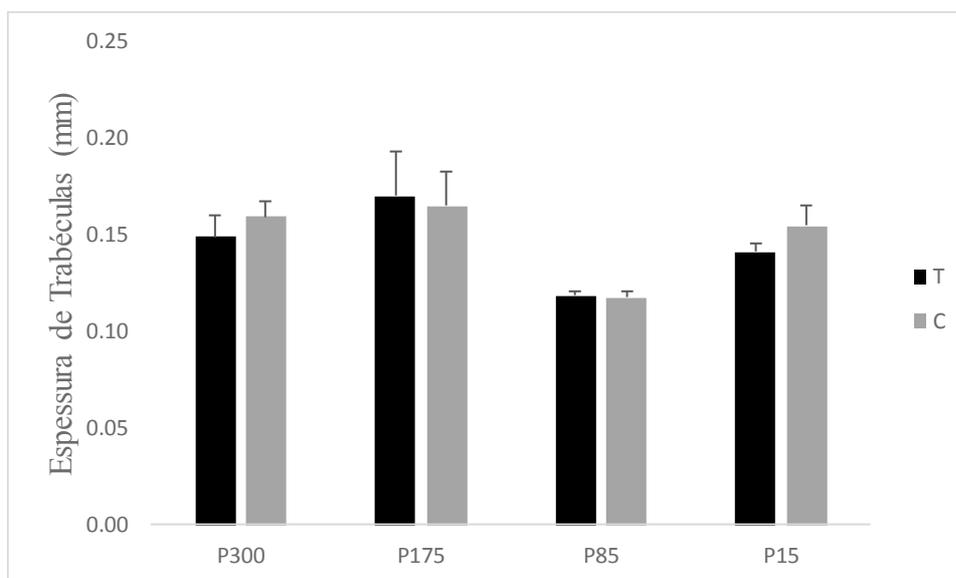


Figura 9 – Espessura de trabéculas (Tb.Th) (mm) após 30 dias, para todos os grupos e fêmures. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas análises intra e intergrupos ($p > 0,05$). As barras representam médias e erros positivos (mm). Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). T: Teste; C: Controle.

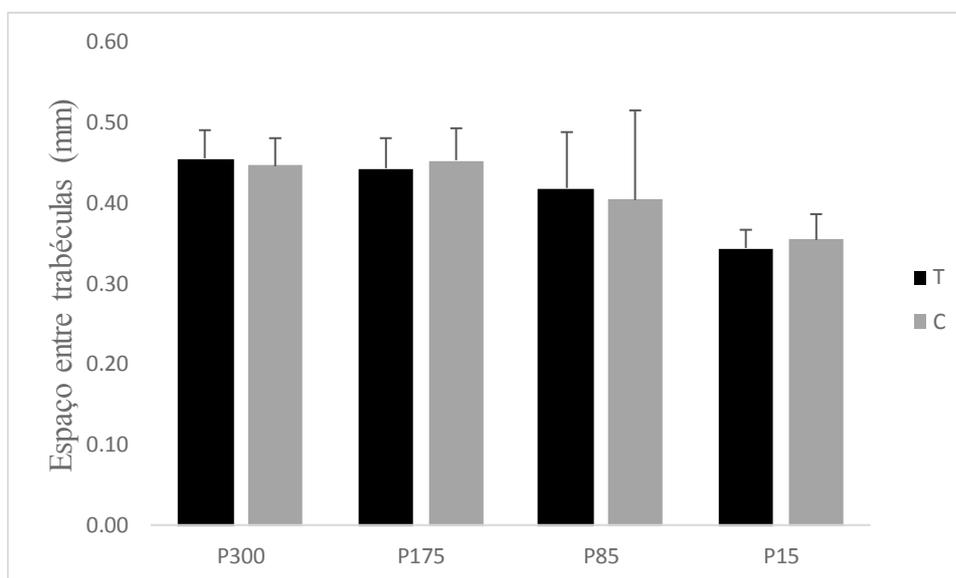


Figura 10 – Espaço entre trabéculas (Tb.Sp) (mm) após 30 dias, para todos os grupos e fêmures. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas análises intra e intergrupos ($p > 0,05$). As barras representam médias e erros positivos. Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). T: Teste; C: Controle.

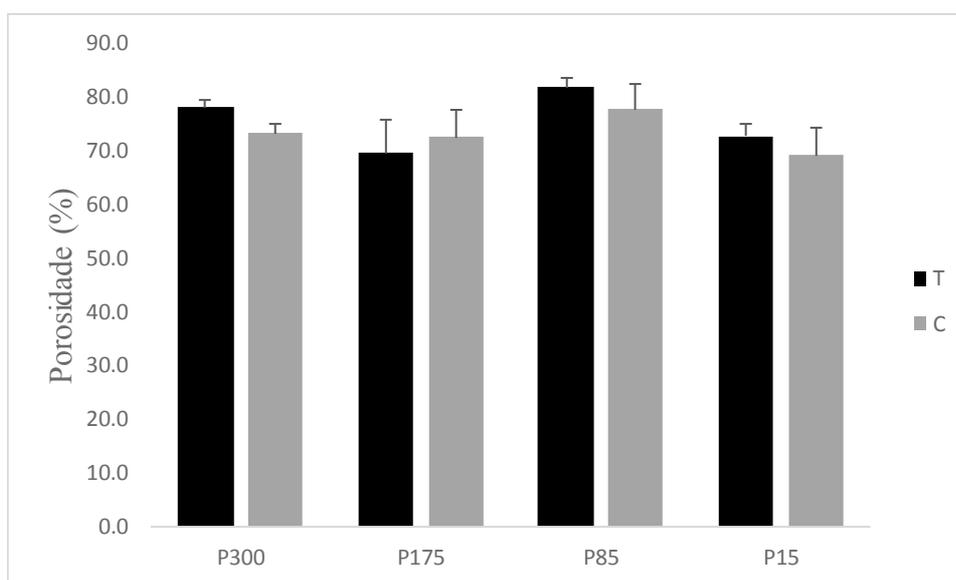
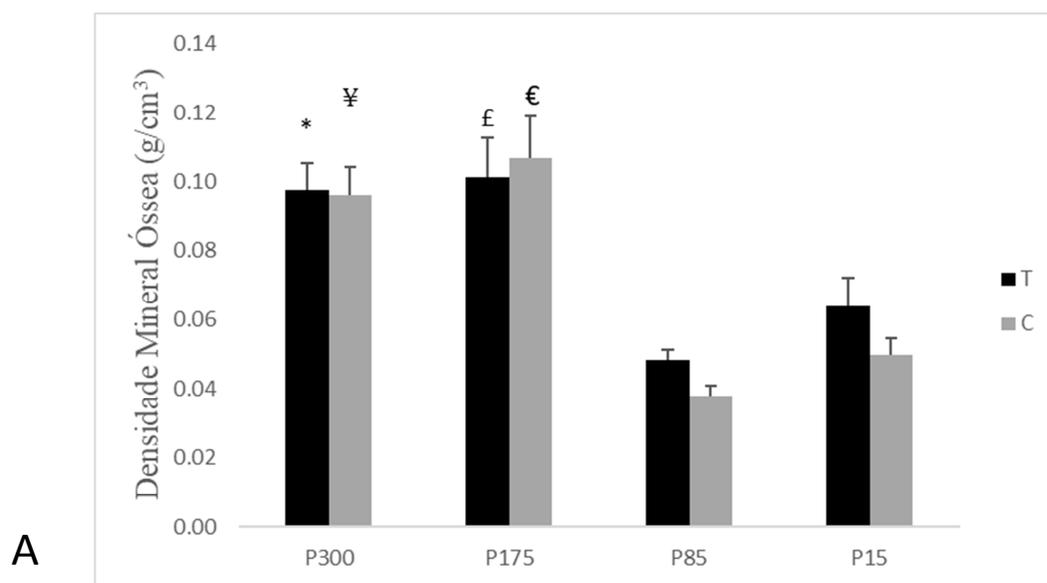


Figura 11 – Porosidade total (%) após 30 dias, para todos os grupos e fêmures. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas análises intra e intergrupos ($p > 0,05$). As barras representam médias e erros positivos (%). Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). T: Teste; C: Controle



B

GRUPOS	Densidade Mineral Óssea (g/cm ³)	
	T	C
Grupo P300	0,10 ± 0,03£	0,10 ± 0,03€
Grupo P175	0,10 ± 0,02*	0,11 ± 0,2¥
Grupo P85	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Grupo P15	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,01

Figura 12 – Densidade Mineral Óssea (DMO) após 30 dias. **A.** No gráfico as barras representam médias e erro positivos da DMO em todos os grupos e fêmures. **B.** A tabela mostra os valores numéricos expressos como médias ± desvios-padrão. Nas comparações intra grupos, relacionando fêmur teste (T) e controle (C), não foram observadas significâncias estatísticas. Nas comparações entre grupos, foram observadas: (£) Diferenças estatisticamente significativas nas comparações P300-T X P85-T, P85-C e P15-C; (€) Diferenças estatisticamente significativas nas comparações P300-C X P85-T, P85-C e P15-C; (*) diferenças estatisticamente significativas nas comparações P175-T X P85-T, P85-C e P15-C; (¥) Diferenças estatisticamente significativas nas comparações P175-C X P85-T, P85-C, P15-T, P15-C. Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). Esse resultado sugere que as malhas dos grupos P300 e P175 permitiram a formação de um tecido ósseo com maior densidade mineral, independente do uso ou não uso de membrana de colágeno.



Figura 13 – Reconstruções tridimensionais realizadas em microtomografia computadorizada in vivo do **grupo P300**, fêmures teste e controle, baseline e 30 dias. Em baseline, pode ser observado o enxerto ósseo (amarelo) posicionado abaixo da malha de titânio. A coloração em azul após 30 dias, corresponde a neoformação óssea.

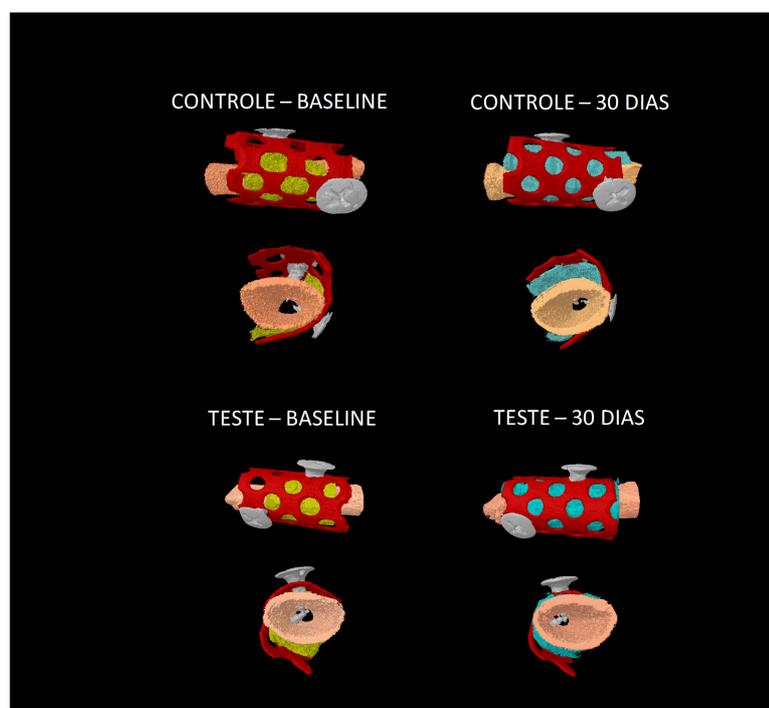


Figura 14 – Reconstruções tridimensionais realizadas em microtomografia computadorizada in vivo do **grupo P175**, fêmures teste e controle, baseline e 30 dias. Em baseline, pode ser observado o enxerto ósseo (amarelo) posicionado abaixo da malha de titânio. A coloração em azul após 30 dias, corresponde a neoformação óssea.

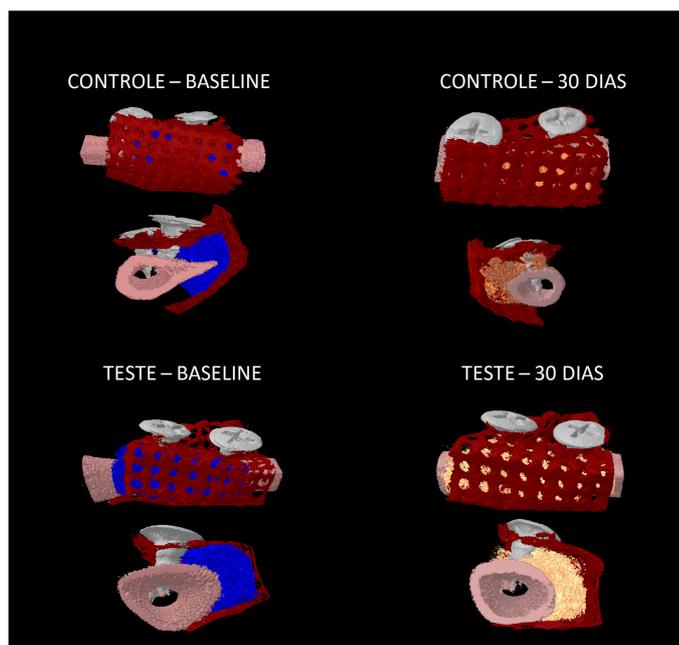


Figura 15 – Reconstituições tridimensionais realizadas em microtomografia computadorizada in vivo do **grupo P85**, fêmures teste e controle, baseline e 30 dias. Em baseline, pode ser observado o enxerto ósseo (azul) posicionado abaixo da malha de titânio. A coloração em amarelo claro após 30 dias, corresponde a neoformação óssea. Através das reconstruções pode ser observado que, ao final de 30 dias, a malha sobre interferência relativa ao movimento do animal.

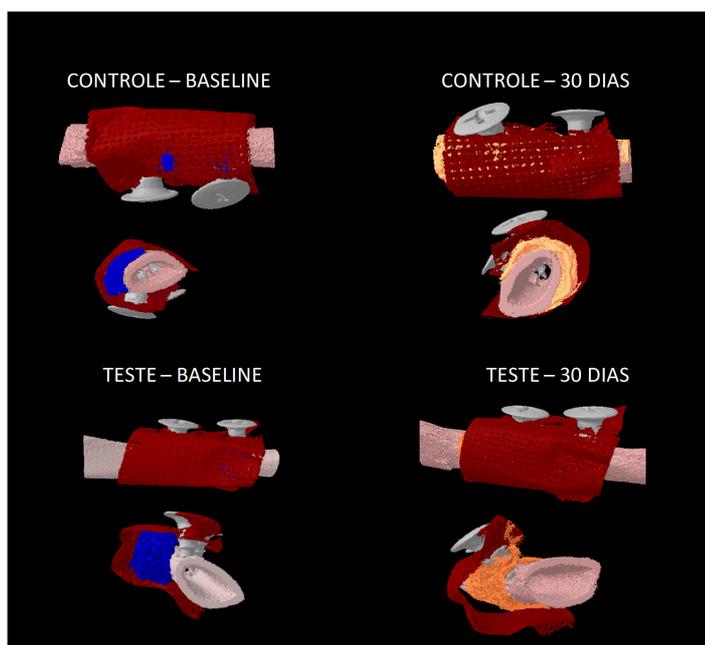


Figura 16 – Reconstituições tridimensionais realizadas em microtomografia computadorizada in vivo do **grupo P15**, fêmures teste e controle, baseline e 30 dias. Em baseline, pode ser observado o enxerto ósseo (azul) posicionado abaixo da malha de titânio. A coloração em amarelo claro após 30 dias, corresponde a neoformação óssea. Através das reconstruções pode ser observado que, ao final de 30 dias, a malha sobre interferência relativa ao movimento do animal.

4.2 Análise histológica

4.2.1 Descrição histológica

O padrão de neoformação óssea observado foi semelhante em todos os grupos, independente do uso da membrana de colágeno. Porém, para facilitar o entendimento e visualização das lâminas, a descrição histológica será feita das imagens capturadas, sendo escolhido dois exemplares de cada grupo, um exemplar do fêmur teste e um exemplar do fêmur controle.

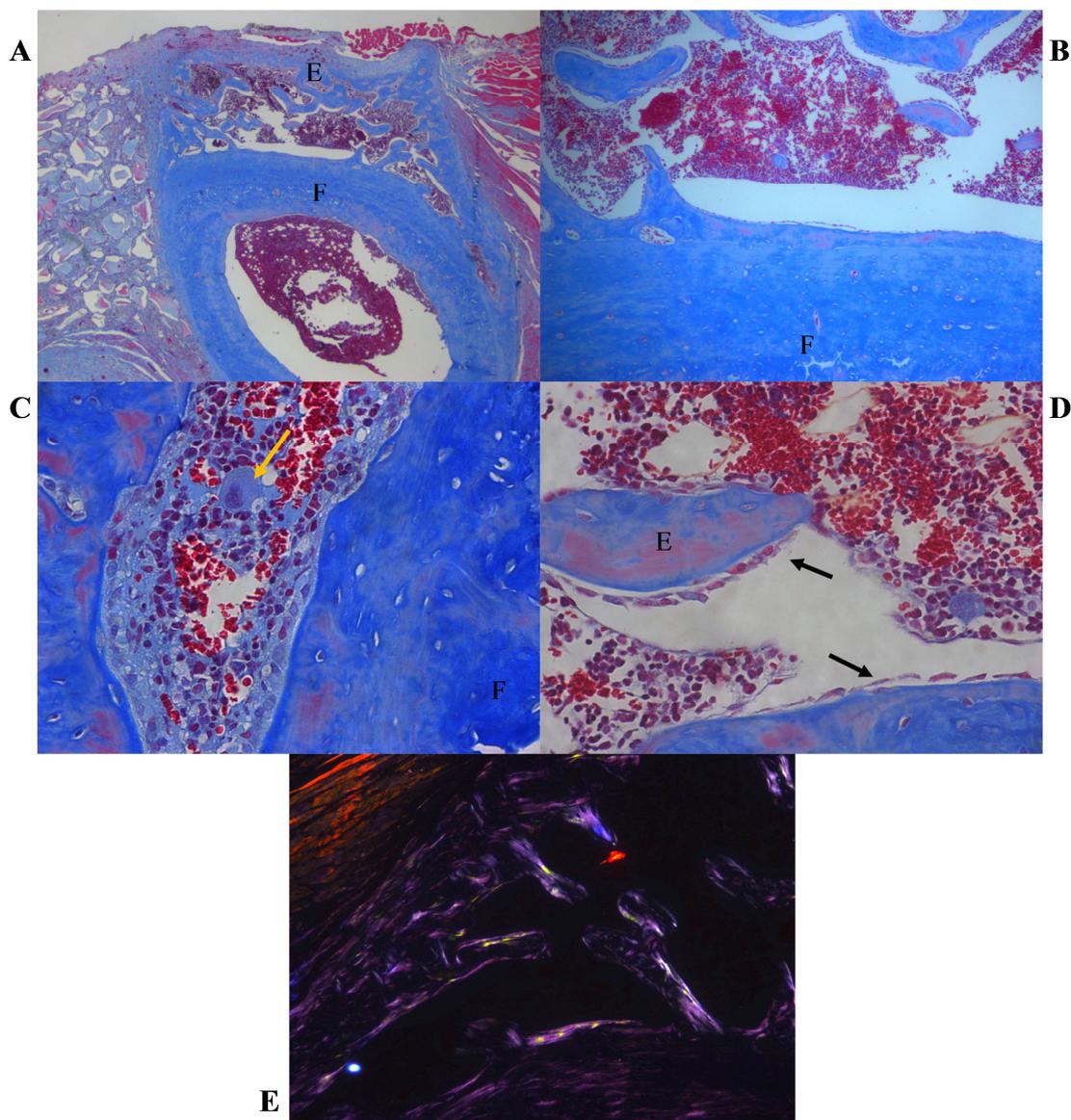


Figura 17 – Exemplos de lâminas histológicas pertencentes ao Grupo P300, fêmur teste. **A** – Visão geral de parte do fêmur (F) em contato com o osso neoformado na região correspondente ao enxerto ósseo (E). Observa-se presença de formação óssea, principalmente na região periférica da área do enxerto, além de espaços com ausência de formação óssea, correspondente a tecido conjuntivo desorganizado e células sanguíneas (Aumento original de 2,5X). **B** – Visualização da interface enxerto-fêmur, na porção mais central da área total. Nesta imagem pode-se observar a íntima relação do novo osso formado pelo enxerto e o fêmur (F) (Aumento original de 10X). **C** – Presença de tecido conjuntivo desorganizado e células sanguíneas, osteoclastos (seta amarela), osteócitos em lacunas, e remanescente de enxerto correspondente a lacunas vazias (Aumento original de 40X). **D** – Presença de osteoblastos alinhados na superfície de osso neoformado e do enxerto (setas pretas), osteoclastos, tecido conjuntivo desorganizado e células sanguíneas (Aumento original de 40X). **E** – Visualização da área enxertada e fêmur sob luz polarizada. Pode-se observar fibras colágenas desorganizadas e áreas isoladas com fibras organizadas correspondentes ao remanescente do enxerto ósseo (Aumento original de 10X).

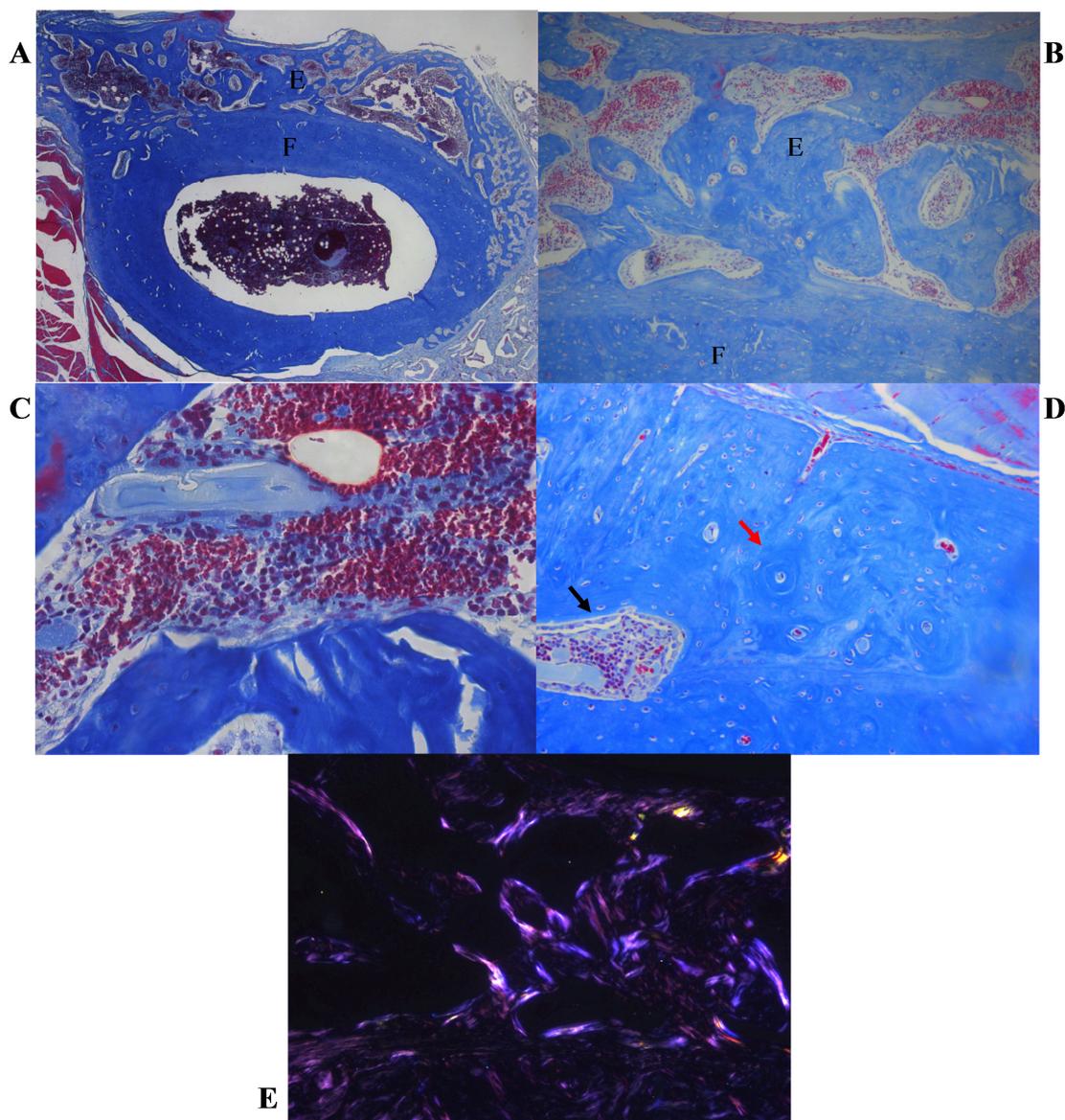


Figura 18 – Exemplos de lâminas histológicas pertencentes ao Grupo P300, fêmur controle. **A** – Visão geral de parte do fêmur em contato com o osso neoformado na região correspondente ao enxerto ósseo. Observa-se presença de formação óssea, principalmente na região periférica e central da área do enxerto. Porém, espaços com ausência de formação óssea, correspondente a tecido conjuntivo desorganizado e células sanguíneas também estão presentes (Aumento original de 2,5X). **B** – Visualização da interface enxerto-fêmur, na porção mais central da área total. Nesta imagem pode-se observar a íntima relação do novo osso formado pelo enxerto e o fêmur (Aumento original de 10X). **C** – Presença de tecido conjuntivo desorganizado, células sanguíneas e remanescente de enxerto (Aumento original de 40X). **D** – Presença de osteoblastos alinhados na superfície de osso neoformado e do enxerto (seta preta), tecido conjuntivo desorganizado e células sanguíneas. Além disso, pode-se observar a presença de osteócitos em lacuna e o início de um processo de amadurecimento com formação de lamelas concêntricas (seta vermelha) (Aumento original de 40X). **E** – Visualização da área enxertada e fêmur sob luz polarizada. Pode-se observar organização de fibras colágenas em algumas áreas, porém muitas são relacionadas ao remanescente do enxerto ósseo (Aumento original de 10X).

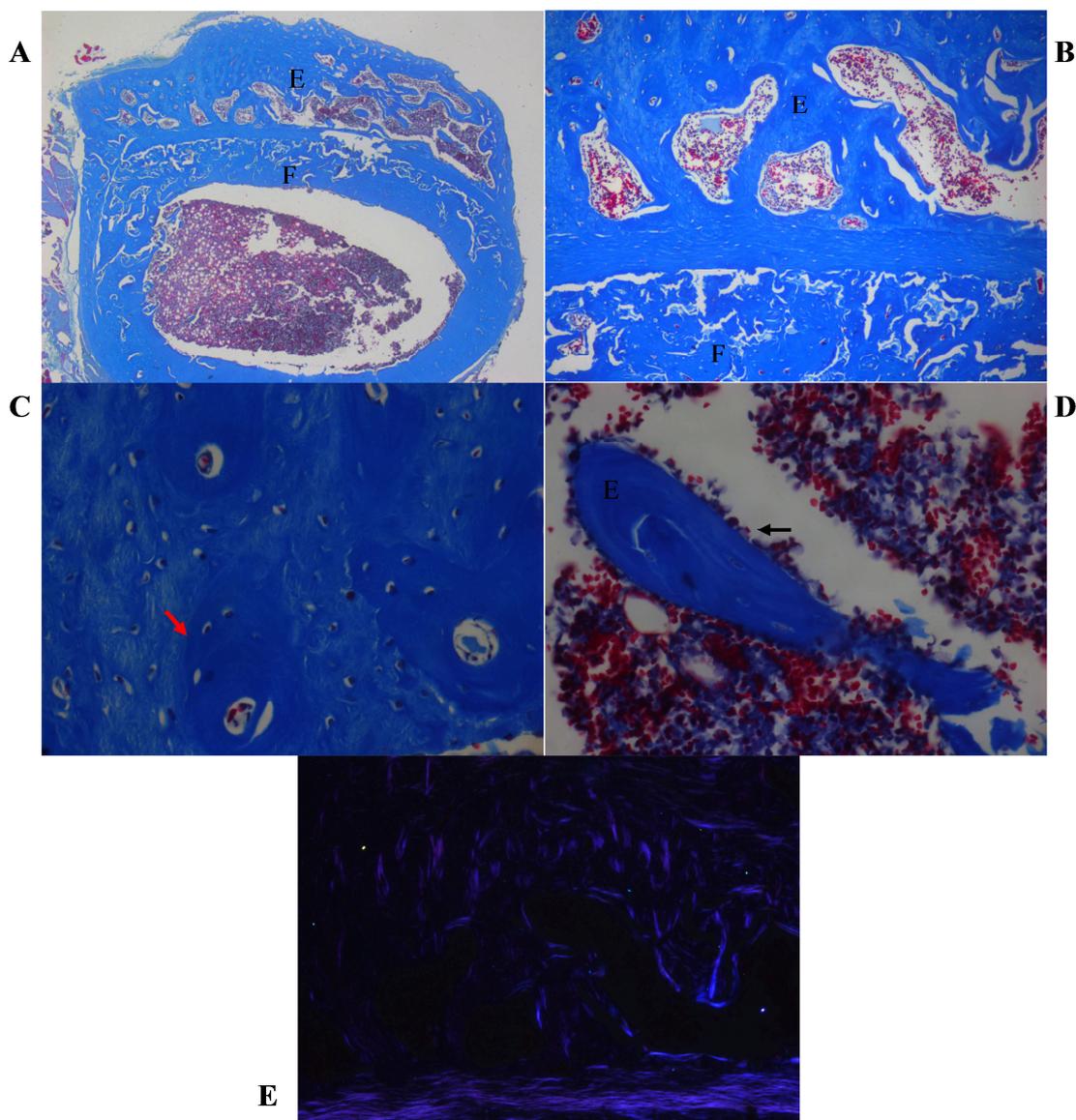


Figura 19 – Exemplos de lâminas histológicas pertencentes ao Grupo P175, fêmur teste. A – Visão geral de parte do fêmur em contato com o osso neoformado na região correspondente ao enxerto ósseo. Observa-se presença de formação óssea, principalmente na região periférica e central da área do enxerto. Porém, espaços com ausência de formação óssea, correspondente a tecido conjuntivo desorganizado e células sanguíneas também estão presentes (Aumento original de 2,5X). **B –** Visualização da interface enxerto-fêmur, na porção mais central da área total. Nesta imagem pode-se observar a íntima relação do novo osso formado pelo enxerto e o fêmur (Aumento original de 10X). **C –** Presença de osteócitos em lacuna e o início de um processo de amadurecimento ósseo com formação de lamelas concêntricas (seta vermelha) (Aumento original de 40X). **D –** Presença de osteoblastos alinhados na superfície do enxerto (seta preta), tecido conjuntivo desorganizado e células sanguíneas (Aumento original de 40X). **E –** Visualização da área enxertada e fêmur sob luz polarizada. Pode-se observar a presença de fibras colágenas desorganizadas (Aumento original de 10X).

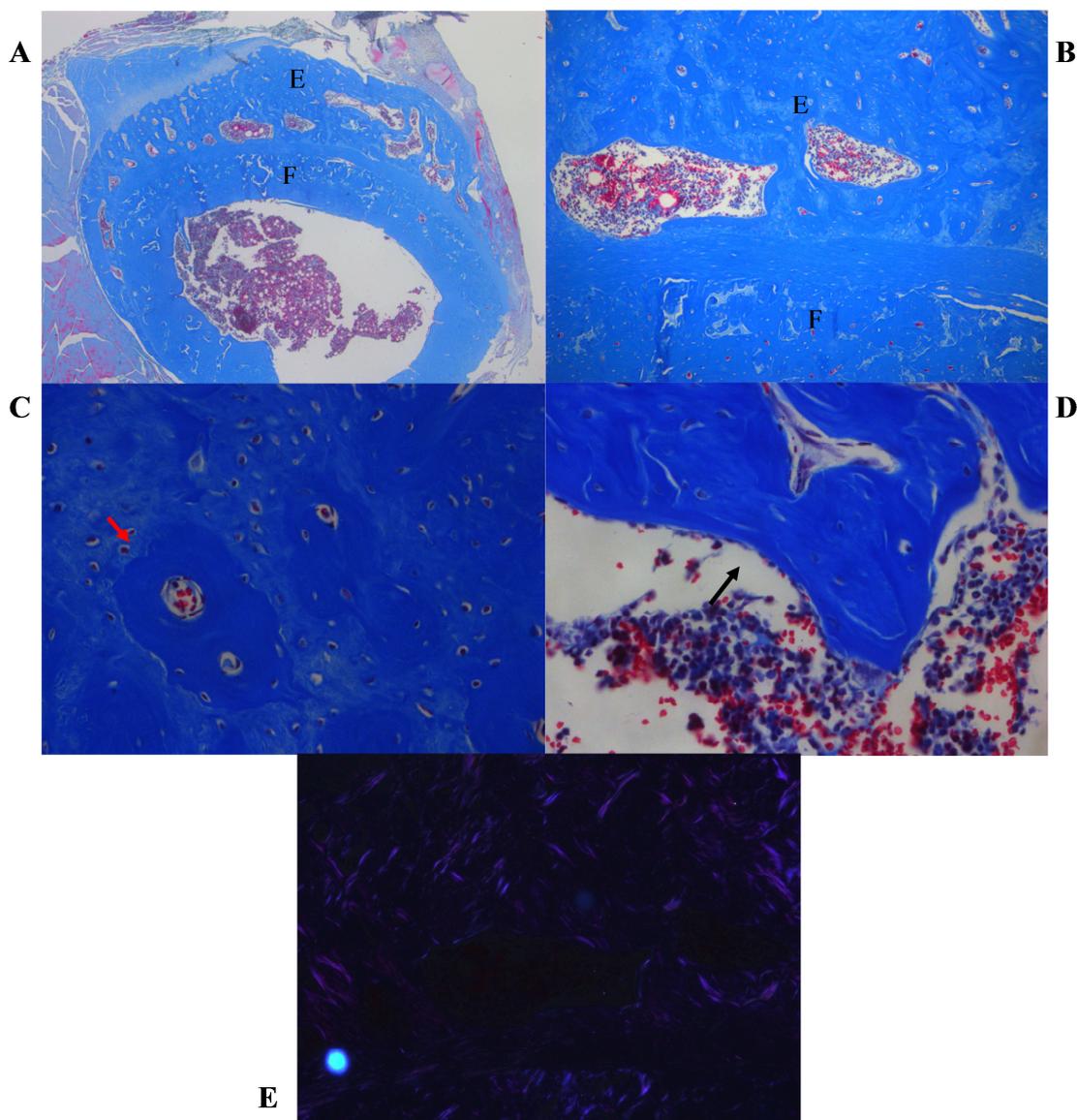


Figura 20 – Exemplos de lâminas histológicas pertencentes ao Grupo P175, fêmur controle. **A** – Visão geral de parte do fêmur em contato com o osso neoformado na região correspondente ao enxerto ósseo. Observa-se presença de formação óssea, principalmente na região periférica e central da área do enxerto. Porém, espaços com ausência de formação óssea, correspondente a tecido conjuntivo desorganizado e células sanguíneas também estão presentes (Aumento original de 2,5X). **B** – Visualização da interface enxerto-fêmur, na porção mais central da área total. Nesta imagem pode-se observar a íntima relação do novo osso formado pelo enxerto e o fêmur (Aumento original de 10X). **C** – Presença de osteócitos em lacuna e o início de um processo de amadurecimento ósseo com formação de lamelas concêntricas (seta vermelha) (Aumento original de 40X). **D** – Presença de osteoblastos alinhados na superfície do enxerto (seta preta), tecido conjuntivo desorganizado e células sanguíneas (Aumento original de 40X). **E** – Visualização da área enxertada e fêmur sob luz polarizada. Pode-se observar a presença de fibras colágenas desorganizadas (Aumento original de 10X).

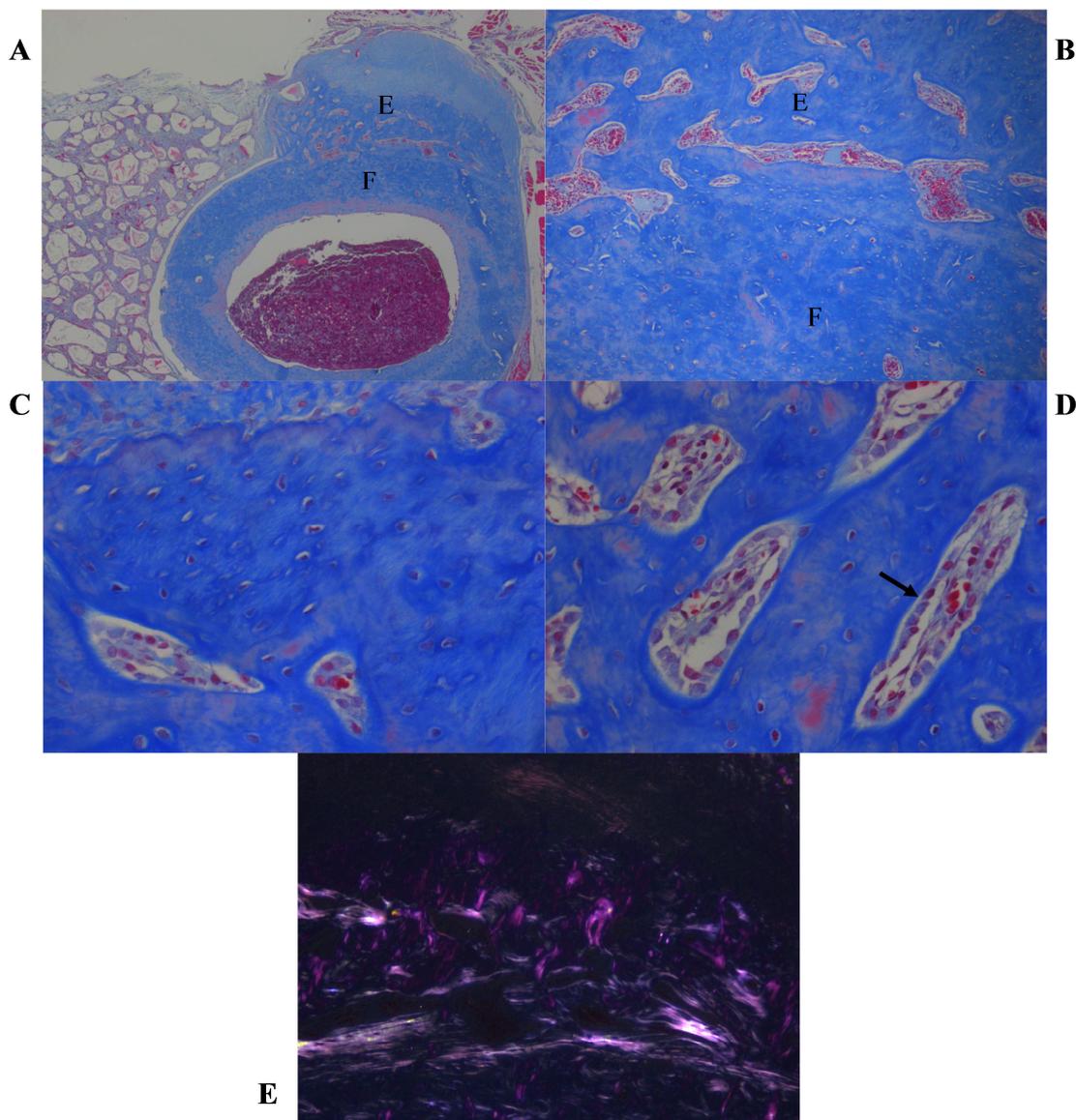


Figura 21 – Exemplos de lâminas histológicas pertencentes ao Grupo P85, fêmur controle. **A** – Visão geral de parte do fêmur em contato com o osso neoformado na região correspondente ao enxerto ósseo. Observa-se presença de formação óssea, principalmente na região periférica e central da área do enxerto. Porém, espaços com ausência de formação óssea, correspondente a tecido conjuntivo desorganizado e células sanguíneas também estão presentes (Aumento original de 2,5X). **B** – Visualização da interface enxerto-fêmur, na porção mais central da área total. Nesta imagem pode-se observar a íntima relação do novo osso formado pelo enxerto e o fêmur (Aumento original de 10X). **C** – Presença de osteócitos em lacuna e áreas isoladas sem osteócitos, podendo ser correspondente ao remanescente de enxerto (Aumento original de 40X). **D** – Presença de osteoblastos alinhados na superfície óssea (seta preta), tecido conjuntivo desorganizado e células sanguíneas (Aumento original de 40X). **E** – Visualização da área enxertada e fêmur sob luz polarizada. Pode-se observar a presença de fibras colágenas desorganizadas (Aumento original de 10X).

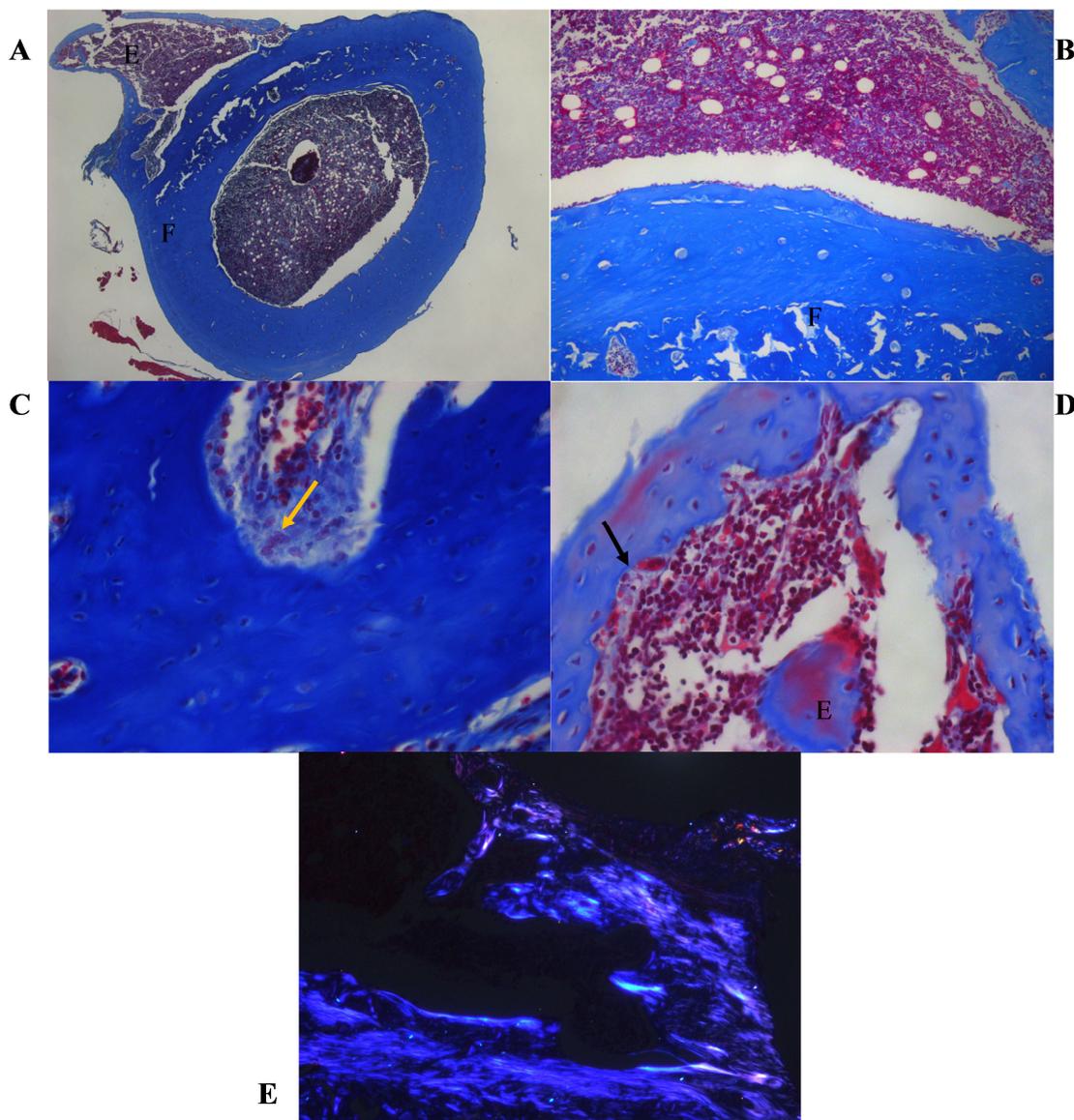


Figura 22 – Exemplos de lâminas histológicas pertencentes ao Grupo P85, fêmur teste. **A** – Visão geral de parte do fêmur em contato com o osso neoformado na região correspondente ao enxerto ósseo. Observa-se presença de formação óssea, principalmente na região periférica da área do enxerto. Porém, espaços com ausência de formação óssea na região central, correspondente a tecido conjuntivo desorganizado e células sanguíneas também estão presentes (Aumento original de 2,5X). **B** – Visualização da interface enxerto-fêmur, na porção mais central da área total. Nesta imagem pode-se observar a íntima relação do novo osso formado pelo enxerto e o fêmur (Aumento original de 10X). **C** – Presença de osteócitos em lacuna, tecido conjuntivo desorganizado, células sanguíneas e osteoclastos (seta amarela) (Aumento original de 40X). **D** – Presença de osteoblastos alinhados na superfície óssea (seta preta), tecido conjuntivo desorganizado e células sanguíneas. Além disso, presença de remanescente de enxerto (E) (Aumento original de 40X). **E** – Visualização da área enxertada e fêmur sob luz polarizada. Pode-se observar a presença de fibras colágenas desorganizadas (Aumento original de 10X).

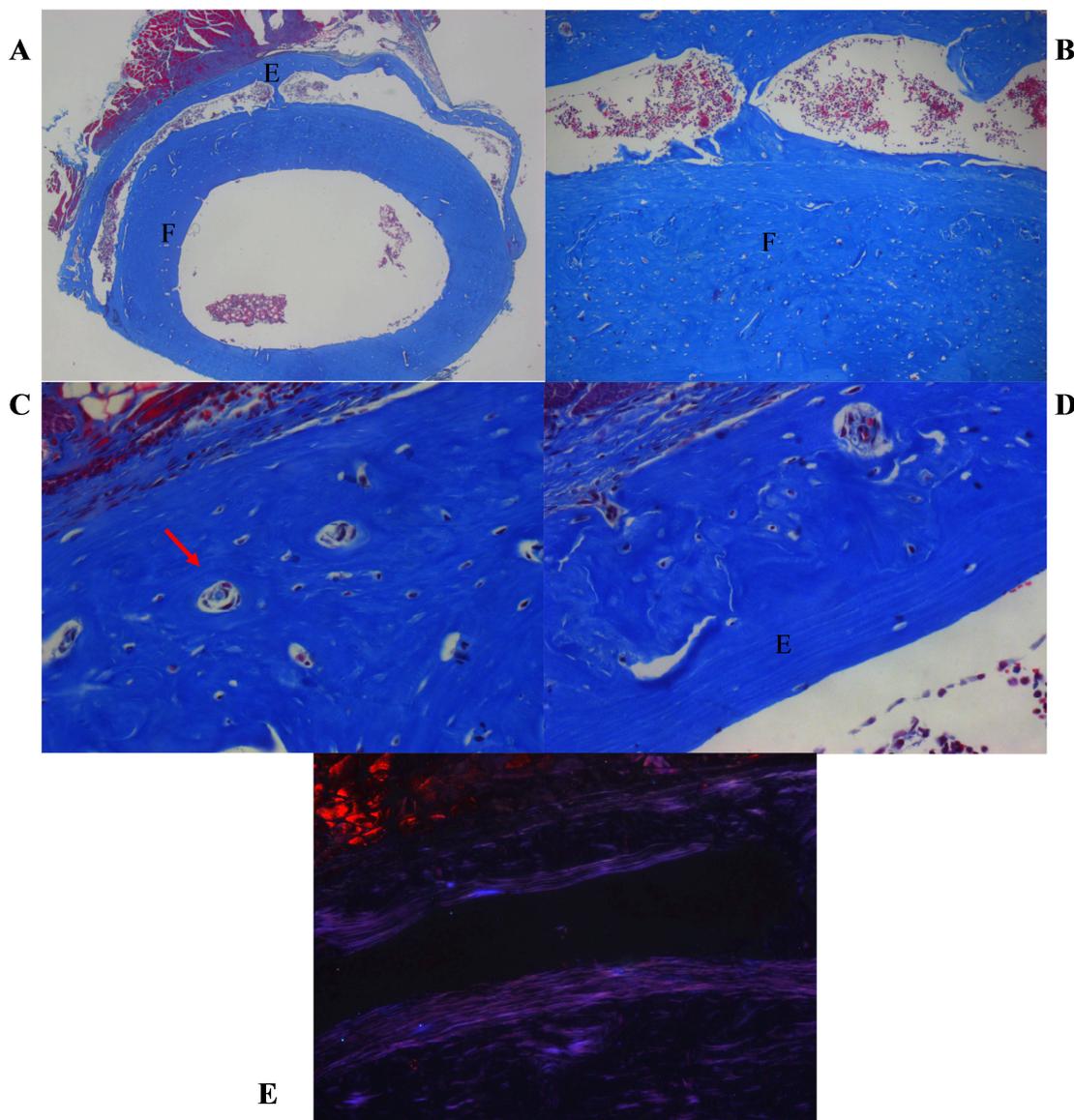


Figura 23 – Exemplos de lâminas histológicas pertencentes ao Grupo P15, fêmur teste.

A – Visão geral de parte do fêmur em contato com o osso neoformado na região correspondente ao enxerto ósseo. Observa-se presença de formação óssea, principalmente na região periférica da área do enxerto. Porém, espaços com ausência de formação óssea na região central, correspondente a tecido conjuntivo desorganizado e células sanguíneas também estão presentes (Aumento original de 2,5X). **B** – Visualização da interface enxerto-fêmur, na porção mais central da área total. Nesta imagem pode-se observar a íntima relação do novo osso formado pelo enxerto e o fêmur (Aumento original de 10X). **C** – Presença de osteócitos em lacuna e o início de um processo de amadurecimento ósseo com formação de lamelas concêntricas (Aumento original de 40X). **D** – Presença de áreas sem osteócitos, compatíveis com remanescente de enxerto (E) (Aumento original de 40X). **E** – Visualização da área enxertada e fêmur sob luz polarizada. Pode-se observar organização de fibras colágenas em algumas áreas, porém muitas são relacionadas ao remanescente do enxerto ósseo (Aumento original de 10X).

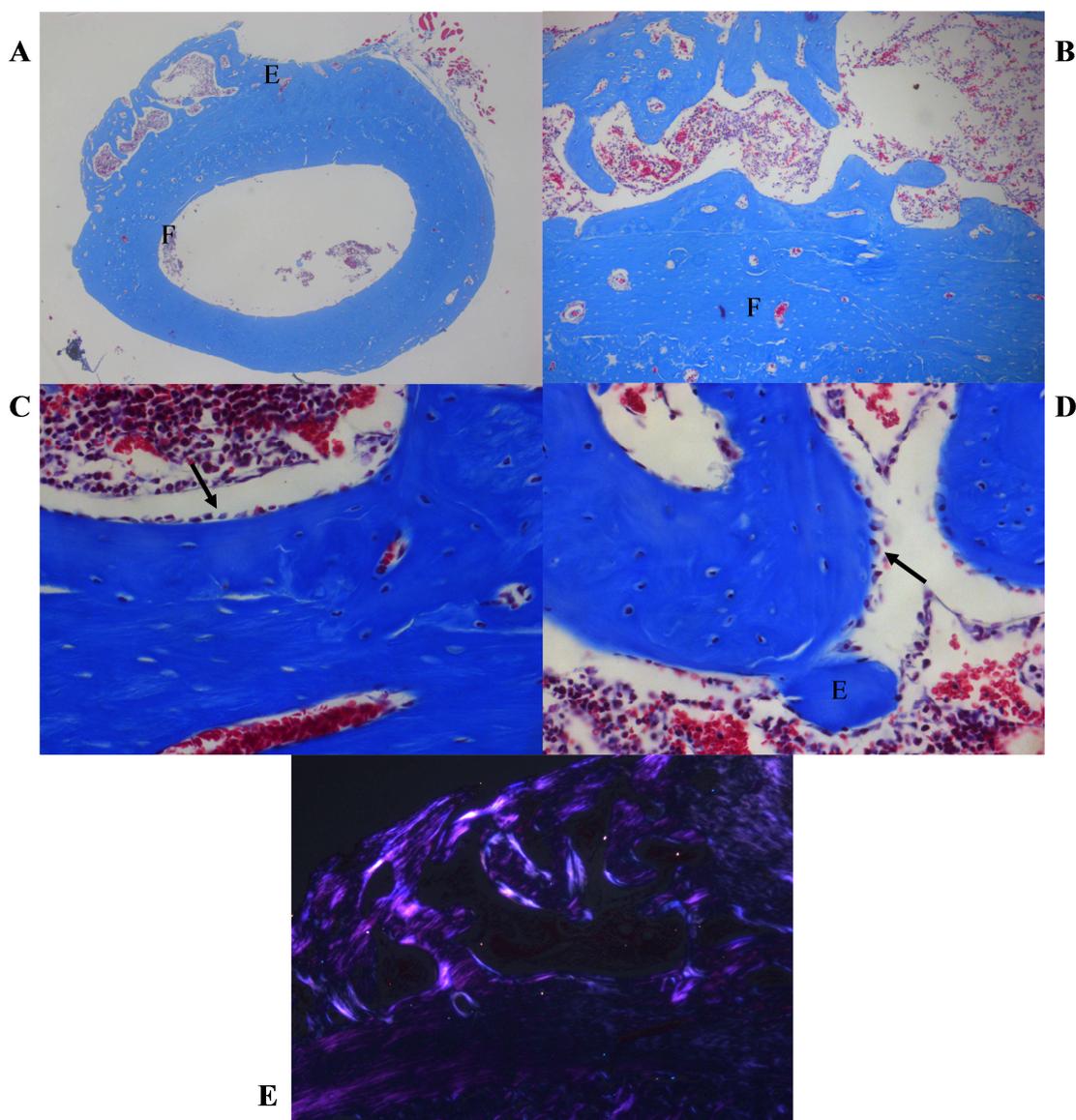


Figura 24 – Exemplos de lâminas histológicas pertencentes ao Grupo P15, fêmur controle. **A** – Visão geral de parte do fêmur (F) em contato com o osso neoformado na região correspondente ao enxerto ósseo (E). Observa-se presença de formação óssea, principalmente na região periférica da área do enxerto, além de espaços com ausência de formação óssea, correspondente a tecido conjuntivo desorganizado e células sanguíneas (Aumento original de 2,5X). **B** – Visualização da interface enxerto-fêmur, na porção mais central da área total. Nesta imagem pode-se observar a íntima relação do novo osso formado pelo enxerto e o fêmur (F) (Aumento original de 10X). **C** – Presença de tecido conjuntivo desorganizado e células sanguíneas, osteoblastos alinhados na superfície de osso neoformado e do enxerto (setas pretas), osteócitos em lacunas, e remanescente de enxerto correspondente a lacunas vazias (Aumento original de 40X). **D** – Presença de osteoblastos alinhados na superfície de osso neoformado e do enxerto (setas pretas) e áreas com ausência de osteócitos, correspondentes a remanescentes do enxerto (E) (Aumento original de 40X). **E** – Visualização da área enxertada e fêmur sob luz polarizada. Pode-se observar fibras colágenas desorganizadas e áreas isoladas com fibras organizadas correspondentes ao remanescente do enxerto ósseo (Aumento original de 10X).

4.3 Análise do tipo ósseo

Os resultados numéricos referente ao tipo ósseo serão demonstrados em tabela e, para facilitar o entendimento, o gráfico será disposto. De acordo com os resultados demonstrados na Figura 13 (A, B) pode-se observar que a porcentagem de áreas não mineralizadas variou de 31,7% a 45,3%. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas comparações intra e intergrupos.

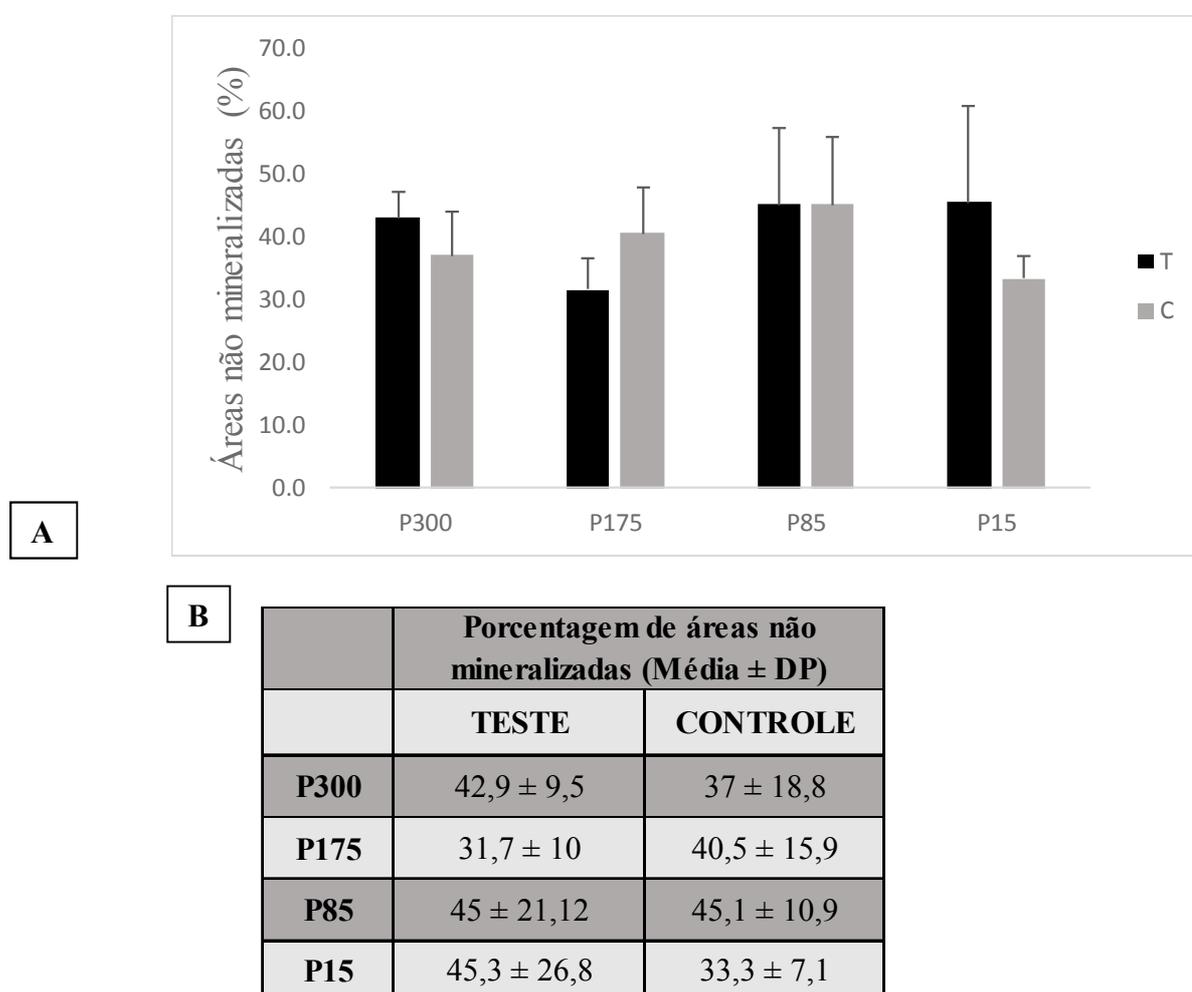


Figura 25 – Porcentagem de áreas não mineralizadas (%). **A** – Gráfico demonstrativo. As barras representam médias e erros positivos. **B** – Tabela demonstrando valores numéricos de médias e desvios-padrão. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas análises intra e intergrupos ($p > 0,05$). As barras representam médias e erros positivos. Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$).

4.4 Medida da interface BC/fêmur

Os resultados numéricos referente a interface BC/fêmur serão demonstrados em tabela e, para facilitar o entendimento, o gráfico será disposto. De acordo com os resultados demonstrados na Figura 14 (A, B), pode-se observar que, na região central do BC (sentido transversal), a formação de novo tecido ósseo em íntimo contato com o fêmur variou entre 73,5% e 89,7%.

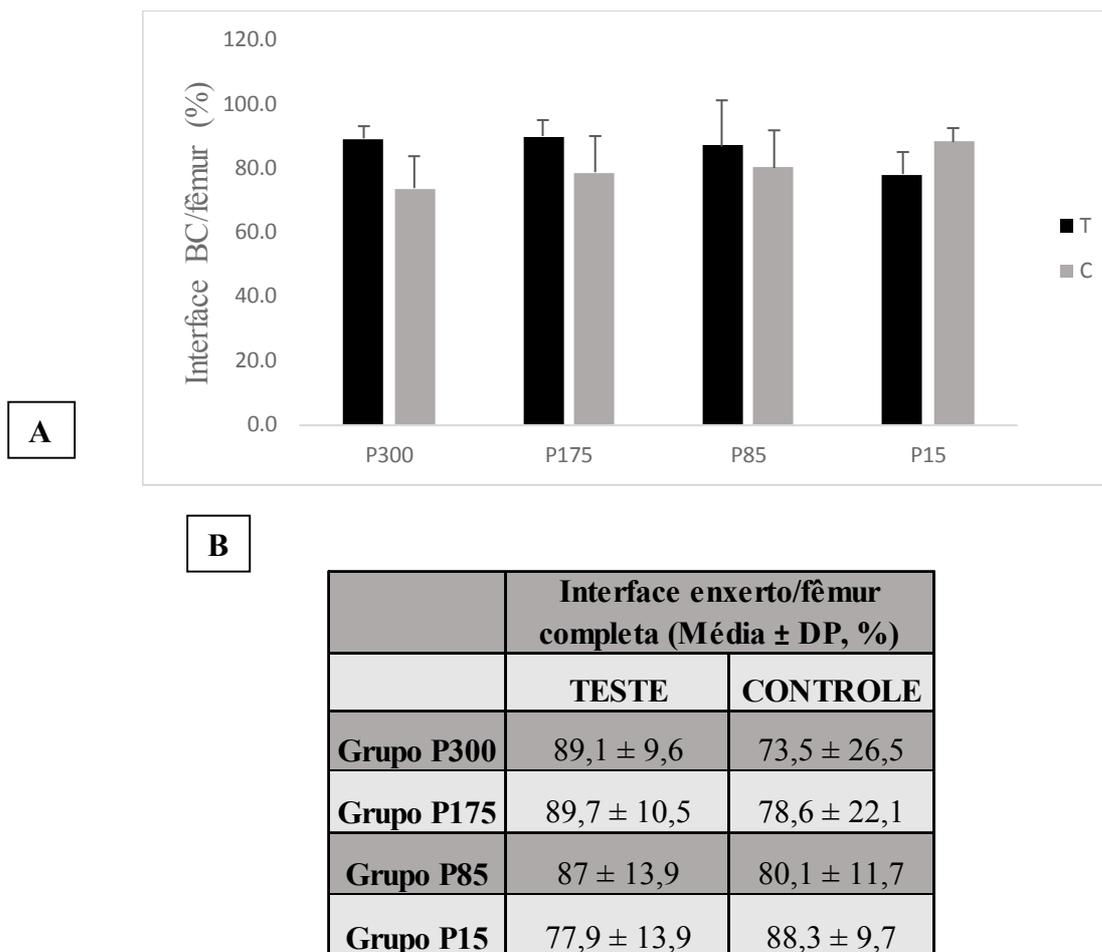


Figura 26 – Porcentagem de interface BC/fêmur completa (%). **A** – Gráfico demonstrativo. As barras representam médias e erros positivos. **B** – Tabela demonstrando valores numéricos de médias e desvios-padrão. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas análises intra e intergrupos ($p > 0,05$). As barras representam médias e erros positivos. Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$).

Em relação a invasão de tecido fibroso no interior do enxerto, foi observado que, apenas para o fêmur controle, ocorreu invasão de tecido conjuntivo desorganizado no interior

do enxerto em um animal de cada grupo. Proporcionalmente, houve invasão de tecido em 14,3%, 20%, 20% e 16,7% nos grupos P300, P175, P85 e P15, respectivamente.

Tecido ósseo organizado em lamelas (ósteons) foi observado em áreas isoladas de enxerto em todos os grupos. Para as malhas com poros maiores que 1 mm (P300 e P175), foi observada uma proporção de 33% tanto no fêmur teste quanto controle. Para as malhas com poros menores que 1 mm (P300 e P175), foi observada uma proporção de 25% para o fêmur teste e 20% para o fêmur controle.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, quatro tipos de malha de titânio foram testados em associação com enxerto ósseo, com o objetivo de avaliar a interferência da espessura e do diâmetro dos poros da malha no novo tecido ósseo formado. O diâmetro dos poros das malhas de titânio utilizadas, variaram de 15 a 300 μm e espessura variando de 4 e 30 μm . Além disso, foi avaliada a influência da membrana de colágeno em reconstruções ósseas utilizando as mesmas malhas. O modelo experimental utilizado foi em fêmur de rato, devido a maior disposição para adaptação das malhas de titânio e parafusos, o qual é caracterizado por formação óssea exofítica, ganhando tecido ósseo fora do arcabouço do esqueleto. Sendo assim, o novo tecido ósseo foi formado por cima da superfície externa do fêmur, sem a criação de um defeito, em oposição a formação óssea circundada por paredes de defeitos ou alvéolos.

A membrana oclusiva utilizada no presente estudo é absorvível, composta por colágeno suíno tipo I e III, em camada dupla. A superfície interna da membrana, voltada para o tecido ósseo, consiste em fibras colágenas desorganizadas, as quais permitem a proliferação de osteoblastos. A superfície externa, voltada para o tecido mole, é densa e previne a proliferação de fibroblastos no interior do defeito (Zitzmann, Naef et al. 1997). Um estudo in vivo em fêmur de rato demonstrou que o processo de absorção da membrana é iniciado após 4 semanas e finalizado após 6 semanas (Bunyaratavej and Wang 2001).

A membrana de colágeno foi utilizada pois, sugeriu-se que a utilização de barreira oclusiva em associação com malhas de titânio poderia minimizar a formação de tecido fibroso indesejado internamente ao defeito ósseo, com o objetivo de adquirir um biomaterial ou combinação de biomateriais que permitisse a formação de tecido ósseo de melhor qualidade (Shin, Herr et al. 2013). Um estudo semelhante avaliou o efeito do uso de membrana de colágeno suíno em conjunto com malha de titânio de 50 μm e enxerto ósseo alógeno na ROG em calvária de coelhos. Após análise histomorfométrica de 8 semanas, os autores observaram formação de novo tecido ósseo de $10.81\% \pm 5.38\%$ e $15.16\% \pm 6.76\%$, nos grupos sem e com a membrana de colágeno, respectivamente, não encontrando diferenças estatisticamente significantes (Shin, Herr et al. 2013). Por outro lado, Lim et al. (Lim, Lee et al. 2015) compararam o uso da malha de titânio sozinha e em associação com membrana de colágeno, na ausência de enxerto ósseo. Observaram que abaixo da malha de titânio, havia presença de tecido fibroso denso quando a membrana não foi utilizada. Porém, os autores observaram grande quantidade de exposição da malha e não utilizaram enxerto ósseo osteocondutor.

Nossos resultados demonstraram algumas semelhanças. Nos fêmures teste, foi observada porcentagem de formação óssea variando entre 18.3% a 30.5%; nos fêmures

controle, foi observada variação de 22.3% a 30.9%, de acordo com o diâmetro do poro das malhas (P300 = 26.8 ± 4.6 ; P175 = 27.5 ± 11.3 ; P85 = 22.3 ± 9.6 ; P15 = 30.9 ± 12.33) (Figura). Não foram observadas diferenças estatísticas nas comparações intra e entre os grupos. Apesar das diferentes análises e porcentagem numérica de novo osso formado, nossos resultados são compatíveis com resultados demonstrados por Shin et al. (Shin, Herr et al. 2013), sugerindo que, na presença de enxerto ósseo osteocondutor, o uso da membrana de colágeno não interfere no volume ósseo final.

O enxerto ósseo BC utilizado no presente estudo é composto pela combinação de partículas inorgânicas de osso bovino e uma matriz purificada de colágeno suíno, na proporção de 9:1. Ao ser comparado com o enxerto de β -tricálcio fosfato para ROG com membrana de colágeno em calvária de rato, o BC demonstrou menor quantidade de novo osso formado além da presença de estruturas semelhantes a tecido ósseo, porém sem osteócitos, sugerindo ser remanescentes do enxerto. Foi observado também que, após 10 semanas, o BC não desenvolveu fechamento completo do defeito formado (Kato, Lemler et al. 2014). Araújo et al. (Araujo, Liljenberg et al. 2010) observaram resultados semelhantes e identificaram preenchimento de 40% com novo osso, após 4 semanas, em alvéolos dentários de cães enxertados com BC.

Nossos resultados demonstraram que, em relação a DMO, foi observado que as malhas com poros de maior diâmetro (P300 e P175) apresentaram maior densidade, sendo a diferença estatisticamente significativa. Porém, ao comparar o uso da membrana de colágeno nas malhas de maior diâmetro, a diferença não foi significativa. Ao avaliar a influência dos poros, Gutta et al. (Gutta, Baker et al. 2009) observaram diferença significativa em relação ao diâmetro após análise histomorfométrica em um estudo em mandíbula de cães utilizando enxerto autógeno removido da tíbia. Os autores sugerem que malhas de titânio com poros de 120 μm apresentam melhor regeneração óssea quando comparado a malhas com diâmetros de 60 μm , apesar da reduzida taxa de aposição mineral. Da mesma forma, Rakhmatia et al. (Rakhmatia, Ayukawa et al. 2014) observaram diferença significativa nos resultados de DMO. Numericamente, os autores observaram densidade entre 8 a 10 g/cm^3 em malhas com diâmetros de 20 a 100 μm . Porém, malhas com diâmetro maior que 100 μm demonstraram reduzida densidade mineral óssea ($p < 0,01$). Os autores ainda complementam que, em relação ao volume ósseo, as malhas não demonstraram diferenças ao comparar o período de cicatrização de 4 e 8 semanas. Os mesmos sugerem que, após a finalização do período de cicatrização, o volume ósseo será semelhante nos diferentes tipos de malha avaliados.

Os valores de DMO encontrados no presente estudo variaram entre 0.04 e 0.11 g/cm³, sendo que nas malhas P300 e P175 a densidade foi de 0.10 e 0.11 g/cm³, respectivamente. Após 30 dias de cicatrização, o BC encontrou-se integrado ao novo osso formado e, através de análise histológica, nossos resultados demonstraram que a porcentagem de áreas não mineralizadas na área enxertada variou de 33.3% a 45.1%. De acordo com Bonucci et al. (Bonucci 2000), a principal diferença entre um osso compacto e esponjoso depende da sua porosidade. A porcentagem de espaços vazios referente aos canais de ósteons, canaliculos dos osteócitos e canais de Volkmann irá determinar a porosidade. Em ossos compactos, os espaços vazios variam de 5 a 30%. Caso a presença de espaços vazios seja maior que 30%, o osso poderá ser caracterizado como esponjoso, com densidade que pode variar de 0.1 a 0.9 g/cm³. Observando os resultados de densidade mineral óssea e porcentagem de áreas não mineralizadas, sugerimos que o tipo do novo osso formado foi esponjoso ou trabecular, para todos os grupos, o qual pode estar relacionado ao enxerto ósseo utilizado, a ausência de defeito ósseo na área enxertada e ao tempo de cicatrização de apenas 30 dias. Além disso, também foi observada presença de lacunas de osteócitos vazias, sugerindo a permanência de remanescentes de enxerto após 30 dias, estando de acordo com os resultados obtidos por Kato et al (Kato, Lemler et al. 2014).

Levando em consideração as características do enxerto ósseo utilizado, a reduzida DMO encontrada pode estar relacionada a influência do enxerto no novo osso formado (esponjoso) e a ausência de preenchimento total da área do enxerto. A quantidade de enxerto ósseo utilizada foi padronizada em todos os animais, mas, devido a maior maleabilidade do material, as malhas P85 e P15 sofreram interferência da movimentação dos tecidos adjacentes, provavelmente devido a espessura de 0,04 mm. Além disso, não foi possível posicionar mais de dois parafusos para estabilização das malhas, considerando a espessura do fêmur do animal. Sendo assim, nas malhas P300 e P175, os parafusos foram posicionados em lados opostos do fêmur e da malha; nas malhas P85 e P15, os parafusos foram posicionados no mesmo lado do fêmur e da malha. A presença dos dois parafusos no mesmo lado pode ter facilitado a movimentação das malhas menos espessas, gerando interferência na densidade mineral óssea.

Ao avaliar a interface entre BC e fêmur, observou-se que 73.5% a 88.3% desta interface estava completa, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O que sugere que, mesmo em áreas com pouca vascularização inicial, o enxerto ósseo pode ser integrado ao tecido ósseo do fêmur. Foi observado que, em 33% das amostras com malhas acima de 1 mm e 20% das amostras com malhas com menos de 1 mm de diâmetro

apresentaram formação isolada de tecido ósseo em lamelas concêntricas (ósteon). Welsh et al. sugeriram que, para se obter formação de ósteon, o ideal seria utilizar malhas com diâmetro de pelo menos 150 μ m. Em nossos resultados, mesmo em proporção baixa, foi possível observar a formação de ósteons em estágios intermediários, em todos os tipos de malha, independente da presença de membrana de colágeno (Welsh, Pilliar et al. 1971). Além disso, invasão de tecido fibroso no interior do enxerto foi observado apenas em fêmures controle, em todos os tipos de malha. Porém, o padrão de tecido e volume ósseo encontrado após 30 dias foi semelhante em todos os grupos, sugerindo que mesmo com formação de tecido mole, o tecido ósseo será formado (Rakhmatia, Ayukawa et al. 2014).

O presente estudo demonstrou limitações em relação a estabilização de malhas com menor espessura (P15 e P85), as quais podem ter sofrido interferência durante a movimentação do animal. Mesmo assim, as análises volumétricas demonstraram resultados compatíveis com os obtidos nos grupos P175 e P300, as quais apresentavam espessura maior, de 30 μ m. Foi sugerido na literatura que malhas com espessura menor que 50 μ m apresentavam tendência ao colapso (Zellin and Linde 1996, Eisig, Ho et al. 2003, Rakhmatia, Ayukawa et al. 2014). Em nossos resultados não observamos interferência da espessura de 30 μ m. Sugerimos que, ao utilizar malhas de menor espessura para grandes reconstruções ósseas verticais, parafusos de ancoragem sejam utilizados com o objetivo de evitar o colapso e redução do ganho ósseo em altura (Jegham, Masmoudi et al. 2017). Diferentes taxas de formação óssea e densidade mineral observadas nos estudos da literatura e nossos resultados sugerem que o diâmetro do poro da malha pode não ser o único fator a interferir na neoformação óssea. Fatores como características físicas do material, espessura, composição química, biocompatibilidade (Galgut, Pitrola et al. 1991), além de vascularização da área e utilização de enxerto ósseo para servir de arcabouço.

6 CONCLUSÕES

Apesar das limitações presentes no trabalho, podemos sugerir que:

- O diâmetro do poro da malha de diâmetro pode interferir na qualidade óssea, porém, dependendo do enxerto ósseo utilizado como osteocondutor, e não a influência da malha de titânio de forma isolada;
- A espessura da malha de titânio não interferiu no processo de formação óssea, a qual seguiu com aumento volumétrico na região enxertada. Porém, a espessura da malha de titânio pode interferir na densidade mineral óssea, caso a malha não seja devidamente estabilizada;
- O uso adicional de membrana de colágeno sobre a malha de titânio, quando associada a enxerto ósseo, não determinou a formação de novo osso de qualidade superior, quando comparada a ausência da membrana de colágeno;
- O padrão de tecido ósseo formado ao utilizar Bio-Oss Collagen no modelo experimental utilizado, é a predominância de osso esponjoso. Sugere-se que, na presença de defeitos com paredes, a exemplo de alvéolos dentários, o enxerto em questão demonstre maior densidade óssea. Estudos com período maior de avaliação devem ser desenvolvidos para melhores esclarecimentos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amler, M. H. (1969). "The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **27**(3): 309-318.
- Araujo, M. G., B. Liljenberg and J. Lindhe (2010). "Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog." Clin Oral Implants Res **21**(1): 55-64.
- Araujo, M. G. and J. Lindhe (2005). "Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog." J Clin Periodontol **32**(2): 212-218.
- Artzi, Z., D. Dayan, Y. Alpern and C. E. Nemcovsky (2003). "Vertical ridge augmentation using xenogenic material supported by a configured titanium mesh: clinicohistopathologic and histochemical study." Int J Oral Maxillofac Implants **18**(3): 440-446.
- Atwood, D. A. (1971). "Reduction of residual ridges: a major oral disease entity." J Prosthet Dent **26**(3): 266-279.
- Bartee, B. K. and J. A. Carr (1995). "Evaluation of a high-density polytetrafluoroethylene (n-PTFE) membrane as a barrier material to facilitate guided bone regeneration in the rat mandible." J Oral Implantol **21**(2): 88-95.
- Becker, W., B. E. Becker, J. Mellonig, R. G. Caffesse, K. Warrer, J. G. Caton and T. Reid (1996). "A prospective multi-center study evaluating periodontal regeneration for Class II furcation invasions and intrabony defects after treatment with a bioabsorbable barrier membrane: 1-year results." J Periodontol **67**(7): 641-649.
- Bonucci, E. (2000). Basic composition and structure of bone. Mechanical testing of bone and the bone-implant interface. D. R. An YH, CRC Press: 3-22.
- Brunel, G., D. Brocard, J. F. Duffort, E. Jacquet, P. Justumus, T. Simonet and E. Benque (2001). "Bioabsorbable materials for guided bone regeneration prior to implant placement and 7-year follow-up: report of 14 cases." J Periodontol **72**(2): 257-264.
- Bunyaratavej, P. and H. L. Wang (2001). "Collagen membranes: a review." J Periodontol **72**(2): 215-229.
- Burchardt, H. (1983). "The biology of bone graft repair." Clin Orthop Relat Res(174): 28-42.
- Cardaropoli, G., M. Araujo and J. Lindhe (2003). "Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs." J Clin Periodontol **30**(9): 809-818.

- Corinaldesi, G., F. Pieri, C. Marchetti, M. Fini, N. N. Aldini and R. Giardino (2007). "Histologic and histomorphometric evaluation of alveolar ridge augmentation using bone grafts and titanium micromesh in humans." J Periodontol **78**(8): 1477-1484.
- Cucchi, A., E. Vignudelli, A. Napolitano, C. Marchetti and G. Corinaldesi (2017). "Evaluation of complication rates and vertical bone gain after guided bone regeneration with non-resorbable membranes versus titanium meshes and resorbable membranes. A randomized clinical trial." Clin Implant Dent Relat Res **19**(5): 821-832.
- Dahlin, C., A. Linde, J. Gottlow and S. Nyman (1988). "Healing of bone defects by guided tissue regeneration." Plast Reconstr Surg **81**(5): 672-676.
- Dupoirieux, L., D. Pourquier, M. C. Picot and M. Neves (2001). "Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects." Int J Oral Maxillofac Surg **30**(1): 58-62.
- Eisig, S. B., V. Ho, R. Kraut and P. Lalor (2003). "Alveolar ridge augmentation using titanium micromesh: an experimental study in dogs." J Oral Maxillofac Surg **61**(3): 347-353.
- Galgut, P., R. Pitrola, I. Waite, C. Doyle and R. Smith (1991). "Histological evaluation of biodegradable and non-degradable membranes placed transcutaneously in rats." J Clin Periodontol **18**(8): 581-586.
- Gutta, R., R. A. Baker, A. A. Bartolucci and P. J. Louis (2009). "Barrier membranes used for ridge augmentation: is there an optimal pore size?" J Oral Maxillofac Surg **67**(6): 1218-1225.
- Hammerle, C. H. and R. E. Jung (2003). "Bone augmentation by means of barrier membranes." Periodontol 2000 **33**: 36-53.
- Hammerle, C. H. and T. Karring (1998). "Guided bone regeneration at oral implant sites." Periodontol 2000 **17**: 151-175.
- Hammerle, C. H. and N. P. Lang (2001). "Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials." Clin Oral Implants Res **12**(1): 9-18.
- Her, S., T. Kang and M. J. Fien (2012). "Titanium mesh as an alternative to a membrane for ridge augmentation." J Oral Maxillofac Surg **70**(4): 803-810.
- Hurley, L. A., F. E. Stinchfield, A. L. Bassett and W. H. Lyon (1959). "The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions." J Bone Joint Surg Am **41-A**: 1243-1254.

- Jegham, H., R. Masmoudi, H. Ouertani, I. Blouza, S. Turki and M. B. Khattech (2017). "Ridge augmentation with titanium mesh: A case report." J Stomatol Oral Maxillofac Surg **118**(3): 181-186.
- Kato, E., J. Lemler, K. Sakurai and M. Yamada (2014). "Biodegradation property of beta-tricalcium phosphate-collagen composite in accordance with bone formation: a comparative study with Bio-Oss Collagen(R) in a rat critical-size defect model." Clin Implant Dent Relat Res **16**(2): 202-211.
- Lim, H. C., M. S. Kim, C. Yang, J. S. Lee, J. Y. Hong, S. H. Choi and U. W. Jung (2015). "The Effectiveness of a Customized Titanium Mesh for Ridge Preservation with Immediate Implantation in Dogs." Clin Implant Dent Relat Res **17 Suppl 2**: e652-660.
- Lim, H. C., J. S. Lee, S. H. Choi and U. W. Jung (2015). "The effect of overlaying titanium mesh with collagen membrane for ridge preservation." J Periodontal Implant Sci **45**(4): 128-135.
- Longoni, S., M. Sartori, D. Apruzzese and M. Baldoni (2007). "Preliminary clinical and histologic evaluation of a bilateral 3-dimensional reconstruction in an atrophic mandible: a case report." Int J Oral Maxillofac Implants **22**(3): 478-483.
- Louis, P. J., R. Gutta, N. Said-Al-Naief and A. A. Bartolucci (2008). "Reconstruction of the maxilla and mandible with particulate bone graft and titanium mesh for implant placement." J Oral Maxillofac Surg **66**(2): 235-245.
- Lundgren, A. K., L. Sennerby and D. Lundgren (1998). "Guided jaw-bone regeneration using an experimental rabbit model." Int J Oral Maxillofac Surg **27**(2): 135-140.
- Maiorana, C., F. Santoro, M. Rabagliati and S. Salina (2001). "Evaluation of the use of iliac cancellous bone and anorganic bovine bone in the reconstruction of the atrophic maxilla with titanium mesh: a clinical and histologic investigation." Int J Oral Maxillofac Implants **16**(3): 427-432.
- Malchiodi, L., A. Scarano, M. Quaranta and A. Piattelli (1998). "Rigid fixation by means of titanium mesh in edentulous ridge expansion for horizontal ridge augmentation in the maxilla." Int J Oral Maxillofac Implants **13**(5): 701-705.
- Miyamoto, I., K. Funaki, K. Yamauchi, T. Kodama and T. Takahashi (2012). "Alveolar ridge reconstruction with titanium mesh and autogenous particulate bone graft: computed tomography-based evaluations of augmented bone quality and quantity." Clin Implant Dent Relat Res **14**(2): 304-311.

- Park, S. H., K. W. Lee, T. J. Oh, C. E. Misch, J. Shotwell and H. L. Wang (2008). "Effect of absorbable membranes on sandwich bone augmentation." Clin Oral Implants Res **19**(1): 32-41.
- Pietrokovski, J. and M. Massler (1967). "Alveolar ridge resorption following tooth extraction." J Prosthet Dent **17**(1): 21-27.
- Proussaefs, P. and J. Lozada (2006). "Use of titanium mesh for staged localized alveolar ridge augmentation: clinical and histologic-histomorphometric evaluation." J Oral Implantol **32**(5): 237-247.
- Rakhmatia, Y. D., Y. Ayukawa, A. Furuhashi and K. Koyano (2013). "Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications." J Prosthodont Res **57**(1): 3-14.
- Rakhmatia, Y. D., Y. Ayukawa, A. Furuhashi and K. Koyano (2014). "Microcomputed tomographic and histomorphometric analyses of novel titanium mesh membranes for guided bone regeneration: a study in rat calvarial defects." Int J Oral Maxillofac Implants **29**(4): 826-835.
- Shin, S. I., Y. Herr, Y. H. Kwon and J. H. Chung (2013). "Effect of a collagen membrane combined with a porous titanium membrane on exophytic new bone formation in a rabbit calvarial model." J Periodontol **84**(1): 110-116.
- Simion, M., S. A. Jovanovic, C. Tinti and S. P. Benfenati (2001). "Long-term evaluation of osseointegrated implants inserted at the time or after vertical ridge augmentation. A retrospective study on 123 implants with 1-5 year follow-up." Clin Oral Implants Res **12**(1): 35-45.
- Strietzel, F. P., P. Khongkhunthian, R. Khattiya, P. Patchanee and P. A. Reichart (2006). "Healing pattern of bone defects covered by different membrane types--a histologic study in the porcine mandible." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **78**(1): 35-46.
- Trombelli, L., R. Farina, A. Marzola, L. Bozzi, B. Liljenberg and J. Lindhe (2008). "Modeling and remodeling of human extraction sockets." J Clin Periodontol **35**(7): 630-639.
- von Arx, T. and B. Kurt (1998). "Implant placement and simultaneous peri-implant bone grafting using a micro titanium mesh for graft stabilization." Int J Periodontics Restorative Dent **18**(2): 117-127.
- Welsh, R. P., R. M. Pilliar and I. Macnab (1971). "Surgical implants. The role of surface porosity in fixation to bone and acrylic." J Bone Joint Surg Am **53**(5): 963-977.

- Zellin, G. and A. Linde (1996). "Effects of different osteopromotive membrane porosities on experimental bone neogenesis in rats." Biomaterials **17**(7): 695-702.
- Zitzmann, N. U., R. Naef and P. Scharer (1997). "Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration." Int J Oral Maxillofac Implants **12**(6): 844-852.
- Zitzmann, N. U., P. Scharer and C. P. Marinello (2001). "Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study." Int J Oral Maxillofac Implants **16**(3): 355-366.
- Zitzmann, N. U., P. Scharer, C. P. Marinello, P. Schupbach and T. Berglundh (2001). "Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: a histologic study in humans." Int J Periodontics Restorative Dent **21**(3): 288-295.

ANEXO



Ribeirão Preto, 15 de março de 2016

Prezado(a) Pesquisador (a) Paulo Esteves Pinto Faria

Vimos por meio desta informar que Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos da Universidade de Ribeirão Preto CEP/UNAERP analisou e aprovou sem restrições, o Projeto intitulado **"AVALIAÇÃO DO GANHO ÓSSEO APÓS POSICIONAMENTO DE DIFERENTES MALHAS DE TITÂNIO ASSOCIADAS A ENXERTO ÓSSEO BOVINO PARTICULADO E MEMBRANA DE COLÁGENO – ESTUDO EM RATOS."**, tendo como pesquisador(a) Paulo Esteves Pinto Faria, registrado sobre o **ComÉt: 15/2015**

Temos ciência de que os estudos estão sendo conduzidos na Universidade de Ribeirão Preto.

Solicitamos que nos encaminhe os relatórios parciais e finais, bem como envie-nos possíveis emendas, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo para que possamos fazer o devido acompanhamento.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luciana Rezende Alves Oliveira

**Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos
Universidade de Ribeirão Preto**

ARTIGOS

ARTIGO 1



Cristine Borges <cdaborges@gmail.com>

Fwd: Submission Confirmation for Titanium mesh pore size and thickness influence - histological and microtomographic in vivo evaluation.

1 mensagem

Mario Taba Junior <mtaba@forp.usp.br>
Para: Cristine Borges <cdaborges@gmail.com>

27 de junho de 2018 11:23

----- Forwarded message -----

From: International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery
<eesserver@eesmail.elsevier.com>
Date: Wed, Jun 27, 2018 at 11:22 AM
Subject: Submission Confirmation for Titanium mesh pore size and thickness influence - histological and microtomographic in vivo evaluation.
To: mtaba@usp.br

Dear Dr. Taba,

We acknowledge, with thanks, the receipt of your manuscript submitted to International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/ijoms/>. Your username is Your username is: mtaba@usp.br.

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/ijoms/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned. Your paper will then be forwarded to the expert reviewers of the Editorial Board for review. Once the results of the reviewing process are available we will advise you.

Thank you for showing your interest in publishing in the International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.

Kind regards,

Jacqui Merrison
IJOMS Editorial Office

Titanium mesh pore size and thickness influence - histological and microtomographic *in vivo* evaluation.

Cristine D'Almeida Borges¹, Monalisa Sena Costa², Milla Sprone Tavares Ricoldi¹, Sérgio Luís Scombatti de Souza¹, Paulo Esteves Pinto Faria², Mário Taba Júnior¹

¹ Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo - Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

² Department of Odontology, University of Ribeirão Preto, Avenida Costábile Romano, 2201, CEP 14096-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Corresponding author:

Mário Taba, Jr. Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo - Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil; e-mail: mtaba@usp.br

Key words: bone regeneration, bone density, spongy bone.

Abstract

Quality and new bone amount is one of the major challenges in today's implantology. Titanium mesh has been demonstrating possibilities of bone reconstruction for vertical and height bone gain. However, morphology factors are discussed to ensure greater predictability. This study aimed to evaluate if there was quality and new bone volume difference by using titanium meshes with different pore size and thicknesses. Twenty-eight Wistar rats were randomly allocated into four main experimental groups, according to mesh pore size in μm : Group P300 (Neodent®; n = 7); Group P175 (Neodent®; n = 7); Group P85: (Bionnovation®; n = 7); Group P15: (Bionnovation®; n = 7). All femurs received bone graft (Bio-Oss Collagen Geistlich®) below titanium mesh. *In vivo* computerized microtomography analysis were made at baseline and 30 days after surgery. Histologic analysis comprehends 30 days samples. Results demonstrated no statistic difference between groups in bone volume ($p > 0.05$). Meshes with pore size > 1 mm demonstrated higher mineral bone density, comparing to meshes with pore size < 1 mm ($p < 0.05$). Despite limitations, this study concluded that thickness of titanium mesh did not interfere in bone formation process and that mesh pore size can interfere in bone quality depending on bone graft used.

Introduction

Trauma, periodontal disease and caries are main causes of tooth loss. When tooth is removed, bone loss occurs, physiologically¹, which may result in aesthetic problems and alveolar atrophy, which is characterized by moderate or severe alveolar resorption due to dental loss². Studies in animals and humans have proved that after tooth loss, alveolar process undergoes in significant resorption and loss of volume^{1, 3}. Alveolar repair usually occurs after 1-2 months through gradual remodeling which includes changes in thickness and height, with a reduction of approximately 40% in height and 60% of alveolar bone thickness¹.

Quality and new bone amount is one of the major challenges in today's implantology. Bone reconstruction techniques are described in scientific articles and aim bone gain that was lost during alveolar physiological healing period. Among techniques available, the most commonly used methods in clinical practice are bone grafts, used for osteoconduction, and guided bone regeneration (GBR). In many cases, GBR's association with bone substitutes is performed, filling and maintaining space, allowing bone formation process⁴⁻⁸.

Studies comparing mechanical barrier type are available in literature since the last 60 years. Among these mechanical barriers, titanium mesh demonstrates possibilities of bone reconstruction^{4, 9-13}. However, morphology factors are discussed to ensure greater predictability. Two main criteria are necessary to guarantee good results when using a mechanical barrier for ROG. The first criterion would be barrier space maintenance, preventing its collapse and facilitating progressive clot transformation into new bone tissue. Studies in literature have been demonstrated space maintenance importance^{9, 14-17}. Barrier also needs to be malleable enough to promote required geometry to ensure bone gain in height and thickness¹⁸. Using titanium meshes, this space maintenance is related to material rigidity and thickness. Authors suggests that titanium meshes with 50 μm thickness are easier to collapse

but is less than membranes without titanium reinforcement^{16, 19, 20}. Material thickness balance is essential to ensure stability, space maintenance and adaptation into the defect¹⁷.

The second important criterion in mechanical barriers is porosity or pores occlusion, which could prevent fibrous connective tissue invasion and its osteoprogenitor cells interference. It is believed that pores presence allows nutrients and oxygen exchange with external environment and improve new bone quality. However, pores also need to be epithelial cells and fibroblasts impermeable^{21, 22}.

Among titanium meshes commercially available, many have pores in millimeter scale. It has been suggested that larger diameter pore size allows new bone angiogenesis and better nutrients diffusion. On the other hand, smaller diameter pore size completely occlusive meshes may limit neovascularization process, but also restrict fibrous connective tissue invasion^{16, 22}. Authors have suggested that bone growth occurs in 50 µm diameter pore size meshes²³. Although mechanical barrier is essential to obtain GBR, good results were demonstrated using different diameter pore size titanium meshes^{4, 10, 16, 19, 24-26}, which shows that results are inconclusive.

Considering little evidence determining titanium mesh pore size and thickness, this study aimed to evaluate if there was quality and new bone volume difference by using titanium meshes with different pore size and thicknesses.

Material and methods

1. Ethical aspects and financial support

Initially, this research project was sent to University of Ribeirão Preto ethics committee (CEP / UNAERP), which was duly approved and registered through code ComÉt: 15/2015.

2. Samples characterization

Twenty-eight male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) with an average weight of 410.8 grams were used in this study, all originated from UNAERP central laboratory. The animals were kept in appropriate plastic boxes with food and water *ad libitum* before and during experimental period, and remained in UNAERP's laboratory in a 12 hours cycle environment of light and temperature between 22 and 24°C.

2.1. Experimental groups

Animals were randomly allocated into four main experimental groups, according to titanium meshes use:

- Group P300: Neodent²⁷ titanium meshes, with 0.3 mm thickness and 3 mm pore size (n = 7);
- Group P175: Neodent²⁸ titanium meshes, with 0.3 mm thickness and 1.75 mm pore size (n = 7);
- Group P85: Bionnovation²⁹ titanium meshes, with 0.04 mm thickness and 0.85 mm pore size (n = 7);
- Group P15: Bionnovation³⁰ titanium meshes. with 0.04 mm thickness and 0.15 pore size (n = 7).

All femurs received bovine bone graft associated with porcine collagen³¹ (BC) below titanium mesh, used as osteoconductor.

²⁷ Neodent® - Grid Panel 20, diamond pore, Curitiba, PR, Brazil

²⁸ Neodent® - Grid Panel 20, circular pore, Curitiba, PR, Brazil

²⁹ Bionnovation® Surgitime Titanium, Bauru, SP, Brazil

³⁰ Bionnovation® Surgitime Titanium, Bauru, SP, Brazil

³¹ Geistlich Bio-Oss® Collagen, São Paulo, SP, Brasil

3. Surgical Procedure

After weighing, animals received general anesthesia, obtained by the association of 0.08 ml / 100g of Ketamine Hydrochloride³² and 0.04 ml / 100g of Xylazine Hydrochloride³³, via intramuscular injection. Subsequently, tricotomy was performed with electric cutter and then local asepsis using a 2% chlorhexidine solution.

Initial incision was made parallel to long axis of the femur, in thigh outer portion, using # 3 scalpel handle, mounted with # 15 scalpel blade³⁴. The incision area was established by femur bulkier portion, through palpation. Muscle tissues were secluded until complete periosteum exposure.

After complete visualization of femur, three perforations were drilled with a 1.3 mm³⁵ attached at a 20: 1 angle³⁶ in 500 rpm under irrigation. Perforations did not reach bone marrow to avoid risk of fracture, just for delimit graft area. Then each block of bone graft BC was equally divided into four samples, so that one BC was enough for four femurs. BC sample was then positioned over perforations and titanium mesh was positioned and fixed with two gingival screws of 5 mm high and 1.6 mm in diameter³⁷. In groups P300 and P175, screws were positioned on femur opposite sides. In groups P85 and P15, screws were positioned only at the top of femur (Figure 1). The bolts were positioned with the aid of a turn key or a rotating angle of 20 rpm. Surgical area was closed using absorbable sutures³⁸.

After surgery, animals received a single intramuscular antibiotic dose of 24,000 IU / kg Penicillin G-benzathine³⁹ at a dose of 0.01 ml per 100 g of the body weight and dipyrone

³² Agener União Ltda, São Paulo, SP, Brazil

³³ Rompum; Bayer SA, São Paulo, SP, Brazil

³⁴ Swann-Morton, Sheffield, England

³⁵ Neodent® Bone Graft Kit, São Paulo, SP, Brasil

³⁶ Konzept-Kavo®, Joinville, SC, Brazil

³⁷ Neodent® gingival screw, Curitiba, PR, Brazil

³⁸ Vicryl Ethicon 5.0, Johnson Prod., São José dos Campos, Brazil

³⁹ Small Porpoid Veterinary Pentabiotic, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brazil

500 mg⁴⁰ in water. Twenty-four hours after surgical procedure, animals were anesthetized using the same anesthesia technique previously reported. Then, each animal was positioned for *in vivo* computerized microtomograph analysis, thus determining baseline analysis.

Animals were kept in appropriate plastic boxes throughout 30-day experimental period. After this period, animals were anesthetized for *in vivo* computerized microtomography (μ -CT) analysis, determining 30 days analysis. At the end, animals were euthanized with intraperitoneal intraperitoneal⁴¹ 150 mg / kg 2.5% sodium thiopentate intraperitoneal injection.

4. In vivo computerized microtomography

For images acquisition, SkyScan Model 1176 Microtomograph⁴² was used. This device consists of a microfocus X-ray tube with high voltage source (65 kV, 382 μ A), resolution of 18 μ m, with copper aluminum filter, rotation step (0,7 / 360°) + 2x off-set camera and 1. Microtomographic analyzes of three - dimensional microarchitecture of graft and neofomed bone were performed. For image processing was used reconstruction software - NRecon v.1.6.9, Analysis Software - DataViewer version 1.4.1 and CTAn v.1.14.4 and 3D Navigation Software - CTVol v.2.2.

In vivo computerized microtomography analysis was performed 24 hours (baseline) and 30 days after surgical procedure. Baseline analysis aimed to capture BC initial volume and serve as reference for comparisons. All measurements were performed by a blind examiner. Titanium mesh and the gingival screws was used as reference to determine region of interest (ROI). Therefore, ROI is the cross-section area selected below titanium mesh (graft or neofomed bone tissue). Summing all collective ROIs, volume of interest (VOI) was

⁴⁰ D-500, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brazil

⁴¹ Thiopentax, Cristália, Brazil

⁴² Bruker-microCT SkyScan, Kontich, Belgium

obtained, representing a selected 3D volume. All volumetric measurements were performed in a VOI. Measurements of tissue volume (TV), bone volume (BV), % of bone formation (BV/TV) and bone mineral density were used for analysis.

5. Histological processing

After euthanasia, right and left femurs were fixed in 10% neutral formalin for 48 hours. Decalcification was carried out by means of 10% ethylenediaminetetraacetic acid solution (pH = 7.0, EDTA), with changes from two to three times a week, for an average period of 60 days, until complete decalcification. Then, samples were washed in running water for 24 hours. In each sample, screw and titanium mesh were removed without damaging surrounding tissues. Dehydration and diaphanization process was started, through successive baths in increasing alcohols and xylol series. After paraffin inclusion, serial sections 5 μ m thick were obtained from the most central point of the graft area, using electronic microtome⁴³. Harris Hematoxylin and Mason Trichrome technique was used for staining.

5.1. Histological analyzes

Sections were analyzed under light microscopy for evaluation of bone quality. Images were captured by a Leica DC 300F camcorder⁴⁴ coupled to a Leica MZFL III stereomicroscope⁴⁵. In a descriptive way, cellular pattern and remaining biomaterial were evaluated.

5.1.1. Characterization of bone type

Bone type definition was determined by image analysis, captured with 2.5X magnification objective. For new bone quantification, a computerized grid measuring 2 cm X 2 cm and containing six columns and six lines was used. The presence of bone formation was

⁴³ Microm HM 335E, SA®, Germany

⁴⁴ Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany

⁴⁵ Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany

determined by intersection points (%) between horizontal and vertical lines. These measures were made at three points: at both peripheral and at the most central point. The final percentage was determined as average.

5.1.2. Measurement of BC/femur interface

Using a 10X magnification objective image, newly formed bone/femur interface was measured in central region of the grafted area, which was considered representative. For this, Image J program⁴⁶ was used.

6. Analysis of results

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 7 statistical program⁴⁷. Microtomographic data and histological measurements of bone type and BC/femur interface were compared between groups through ANOVA two criteria test, with Tukey post test. A significance level of 5% was used for all statistical analyzes.

Results

Surgical procedure occurred with some interurrences. Group P175 and P85 lost two animals in each group. P15 group lost one animal, totaling 23 animals in the experiment. Excluded animals were euthanized because of fractures or because they became weakened during healing period. In this way, experimental groups presented sample number as: group P300 - N = 7; Group P175 -N = 5; Group P85 -N = 5; Group P15 - N = 6.

1. Volumetric measurements

For better compression, numerical values were distributed in graphs for each three-dimensional parameter evaluated. Initially, a lower tissue graft volume was observed in the P300 and P175 groups. After the 30-day period, tissue volume was similar in all groups. In all

⁴⁶ National Institutes of Health, Bethesda, USA

⁴⁷ GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA

volumetric parameters after 30 days, no statistically significant differences were observed (Figure 2).

In relation to bone mineral density (BMD) after 30 days, denser tissue was observed in the titanium meshes with pore size > 1 mm ($p < 0.05$), with mean and standard deviation of 0.1 ± 0.03 and 0.11 ± 0.2 for groups P300 and P175, respectively (Figure 2).

2. Histological analysis

2.1. Histological description

Bone neoformation pattern was similar in all groups. It was observed presence of bone formation, mainly in peripheral graft area region, besides spaces with absence of bone formation, corresponding to disorganized connective tissue and blood cells. In addition, presence of isolated osteoclasts, osteocytes in gaps, empty gaps corresponding to remnant graft, osteoblasts aligned on new bone surface and graft (Figures 3, 4, 5 and 6).

2.2. Bone type analysis

According to results, percentage of non-mineralized areas were 37 ± 18.8 , 40.5 ± 15.9 , 45.1 ± 10.9 , 33.3 ± 7.1 for P300, P175, P85 and P15, respectively. No statistically significant differences were observed in intergroup comparisons.

2.3. BC/femur interface

According to results, in grafted central region, new bone formation were in close contact with femur in 73.5 ± 26.5 , 78.6 ± 22.1 , 80.1 ± 11.7 , 88.3 ± 9.7 for P300, P175, P85 and P15, respectively. No statistically significant differences were observed in intergroup comparisons.

Discussion

In this present study, four different types of titanium mesh were used in association to bone graft in order to evaluate the influence of mesh thickness and pore size in new bone formation. Pore size ranged from 15 to 300 μm , and thickness from 4 and 30 μm . The model used in the study was a rat femur, due to greater disposition in adapt titanium meshes. In addition, exophytic bone formation model, to gain bone tissue out of skeletal framework, was used as opposed to bone formation surrounded by defect walls or alveoli. Thus, new bone tissue was formed over the outer surface of femur, without creating a defect. The osteoconductive bone graft used is composed of inorganic bovine bone particles and a purified matrix of porcine collagen in a ratio of 9:1.

Through *in vivo* $\mu\text{-CT}$ results, it was observed that there was no volumetric difference in new bone formed using different pore size. Numerically, P15 mesh showed a higher percentage of bone volume (30.9 ± 12.33) when compared to other groups ($P300 = 26.8 \pm 4.6$, $P175 = 27.5 \pm 11.3$, $P85 = 22.3 \pm 9.6$). Rakhmatia et al.¹⁶ also did not observe significant difference in volumetric parameters due to pore size after 8 weeks in rats. In this case, titanium mesh was used without bone graft in a 7 mm defect in rat calvaria. Also, they observed that mesh thickness between 100 and 200 μm would be ideal for larger bone reconstructions, avoiding collapse within the defect.

Looking at BMD results, it was observed that meshes with larger pore size presented higher density, statistically. Gutta et al.²⁷ observed significant difference in pore size after histomorphometric analysis in a dog jaw study, using autogenous graft removed from tibia. They suggested that titanium meshes with 120 μm pore size present better bone regeneration when compared to meshes with 60 μm , despite mineral apposition low rate. Likewise, Rakhmatia et al.¹⁶ observed significant difference in BMD where they observed density ranging from 8 to 10 g/cm^3 in meshes with 20 to 100 μm pore size. However, meshes with

pore size greater than 100 μm showed reduced BMD ($p < 0.01$). Our values varied between 0.04 and 0.11 g/cm^3 , where P300 and P175 obtained higher BMD of 0.10 and 0.11 g/cm^3 , respectively.

After 30 days, bone graft was integrated into newly formed bone and, through histological analysis, our results demonstrated percentage of non-mineralized areas ranging from 33.3% to 45.1%. According to Bonucci²⁸, the main difference between compact and spongy bone depends on its porosity. The percentage of voids related to osteon channels, osteocyte canaliculi and Volkmann channels will determine porosity. In compact bones, voids range from 5 to 30%. If presence of voids is greater than 30%, bone may be characterized as spongy, with density ranging from 0.1 to 0.9 g/cm^3 . Looking at BMD and percentage of non-mineralized areas results, we suggest that newly formed bone type was spongy for all groups, which may be related to bone graft used, absence of bone defect in grafted area and healing period of only 30 days. In addition, it was also observed presence of empty osteocyte gaps, suggesting remaining bone graft after 30 days, being in agreement with the results obtained by Kato et al²⁹.

Thus, we can observe difficulties of comparison between studies due to differences in relation to experimental model used, presence of osteoconductive bone graft and adequate tissue stabilization, which may have undergone mechanical actions related to animal movement in femur model. Some authors have suggested that pore size has no influence on bone formation and clinical outcome. Barriers with larger diameters could promote osteogenesis at earlier stages, but not alter bone formation amount at the end of healing period^{16, 19}.

When evaluating BC/femur interface, it was observed that 73.5% to 88.3% of this interface was complete, and there was no statistically significant difference between groups. This suggests that, even in exophytic areas, BC may be integrated into femoral bone tissue.

Also, 33% of samples with pore size > 1 mm and 20% of samples with pore size < 1 mm presented isolated formation of bone tissue in concentric lamellae (osteon). It was suggested that, in order to obtain osteon formation, it would be ideal to use meshes with pore size of at least $150 \mu\text{m}^{23}$. In our results, even in low proportion, it was possible to observe osteons formation in intermediate stages, in all pore size.

This present study demonstrated limitations in relation to thinner meshes (P15 and P85) stabilization, which may have suffered interference during animal movement. Even so, volumetric analyzes showed results compatible with those obtained in groups P175 and P300, which had thickness of $30 \mu\text{m}$. It has been suggested in the literature that meshes with thickness less than $50 \mu\text{m}$ showed a tendency to collapse^{16, 19, 20}. Our results showed no interference of $30 \mu\text{m}$ thickness. We suggest that, when using thinner meshes for large vertical bone reconstructions, screw tents should be used in order to avoid collapse and reduction of bone gain³⁰. Different rates of bone formation and BMD observed in the literature studies and our results suggest that mesh pore size may not be the only factor interfering new bone formation. Factors such as physical characteristics of material, thickness, chemical composition, biocompatibility³¹, besides vascularization and use of bone graft to serve as a framework.

Despite limitations, thickness of titanium mesh did not interfere in bone formation process, which followed with volumetric increase in grafted region. We can also suggest that mesh pore size can interfere in BMD, however, depending on bone graft used as osteoconductor, and not only titanium mesh influence.

Acknowledgement and Conflict of Interest: This study received financial assistance through biomaterials donation from the following companies: Neodent®, Geistlich® Pharma and Bionnovation® Biomedical. Study sponsors had no involvement in study design, analysis, interpretation data and manuscript writing.

References

1. Araujo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2005;32:212-218.
2. Atwood DA. Reduction of residual ridges: a major oral disease entity. *J Prosthet Dent* 1971;26:266-279.
3. Pietrokovski J, Massler M. Alveolar ridge resorption following tooth extraction. *J Prosthet Dent* 1967;17:21-27.
4. Artzi Z, Dayan D, Alpern Y, Nemcovsky CE. Vertical ridge augmentation using xenogenic material supported by a configured titanium mesh: clinicohistopathologic and histochemical study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:440-446.
5. Zitzmann NU, Naef R, Scharer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12:844-852.
6. Hammerle CH, Jung RE. Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontol* 2000 2003;33:36-53.
7. Stricker A, Fleiner J, Stubinger S, Fleiner H, Buser D, Bosshardt DD. Ridge preservation after ridge expansion with simultaneous guided bone regeneration: a preclinical study. *Clin Oral Implants Res* 2016;27:e116-e124.
8. Kammerer PW, Palarie V, Schiegnitz E, Nacu V, Draenert FG, Al-Nawas B. Influence of a collagen membrane and recombinant platelet-derived growth factor on vertical bone augmentation in implant-fixed deproteinized bovine bone--animal pilot study. *Clin Oral Implants Res* 2013;24:1222-1230.
9. Maiorana C, Santoro F, Rabagliati M, Salina S. Evaluation of the use of iliac cancellous bone and anorganic bovine bone in the reconstruction of the atrophic maxilla with titanium mesh: a clinical and histologic investigation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:427-432.
10. Proussaefs P, Lozada J. Use of titanium mesh for staged localized alveolar ridge augmentation: clinical and histologic-histomorphometric evaluation. *J Oral Implantol* 2006;32:237-247.
11. Corinaldesi G, Pieri F, Marchetti C, Fini M, Aldini NN, Giardino R. Histologic and histomorphometric evaluation of alveolar ridge augmentation using bone grafts and titanium micromesh in humans. *J Periodontol* 2007;78:1477-1484.
12. Longoni S, Sartori M, Apruzzese D, Baldoni M. Preliminary clinical and histologic evaluation of a bilateral 3-dimensional reconstruction in an atrophic mandible: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007;22:478-483.
13. Malchiodi L, Scarano A, Quaranta M, Piattelli A. Rigid fixation by means of titanium mesh in edentulous ridge expansion for horizontal ridge augmentation in the maxilla. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:701-705.
14. Simion M, Jovanovic SA, Tinti C, Benfenati SP. Long-term evaluation of osseointegrated implants inserted at the time or after vertical ridge augmentation. A retrospective study on 123 implants with 1-5 year follow-up. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:35-45.
15. Brunel G, Brocard D, Duffort JF, et al. Bioabsorbable materials for guided bone regeneration prior to implant placement and 7-year follow-up: report of 14 cases. *J Periodontol* 2001;72:257-264.
16. Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Microcomputed tomographic and histomorphometric analyses of novel titanium mesh membranes for guided bone regeneration: a study in rat calvarial defects. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2014;29:826-835.

17. von Arx T, Kurt B. Implant placement and simultaneous peri-implant bone grafting using a micro titanium mesh for graft stabilization. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998;18:117-127.
18. Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *J Prosthodont Res* 2013;57:3-14.
19. Zellin G, Linde A. Effects of different osteopromotive membrane porosities on experimental bone neogenesis in rats. *Biomaterials* 1996;17:695-702.
20. Eisig SB, Ho V, Kraut R, Lalor P. Alveolar ridge augmentation using titanium micromesh: an experimental study in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:347-353.
21. Barteck BK, Carr JA. Evaluation of a high-density polytetrafluoroethylene (n-PTFE) membrane as a barrier material to facilitate guided bone regeneration in the rat mandible. *J Oral Implantol* 1995;21:88-95.
22. Her S, Kang T, Fien MJ. Titanium mesh as an alternative to a membrane for ridge augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2012;70:803-810.
23. Welsh RP, Pilliar RM, Macnab I. Surgical implants. The role of surface porosity in fixation to bone and acrylic. *J Bone Joint Surg Am* 1971;53:963-977.
24. Dupoirieux L, Pourquoi D, Picot MC, Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001;30:58-62.
25. Lundgren AK, Sennerby L, Lundgren D. Guided jaw-bone regeneration using an experimental rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998;27:135-140.
26. Miyamoto I, Funaki K, Yamauchi K, Kodama T, Takahashi T. Alveolar ridge reconstruction with titanium mesh and autogenous particulate bone graft: computed tomography-based evaluations of augmented bone quality and quantity. *Clin Implant Dent Relat Res* 2012;14:304-311.
27. Gutta R, Baker RA, Bartolucci AA, Louis PJ. Barrier membranes used for ridge augmentation: is there an optimal pore size? *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67:1218-1225.
28. Bonucci E. Basic composition and structure of bone. In: An YH DR, ed. *Mechanical testing of bone and the bone-implant interface*: CRC Press, 2000:3-22.
29. Kato E, Lemler J, Sakurai K, Yamada M. Biodegradation property of beta-tricalcium phosphate-collagen composite in accordance with bone formation: a comparative study with Bio-Oss Collagen(R) in a rat critical-size defect model. *Clin Implant Dent Relat Res* 2014;16:202-211.
30. Jegham H, Masmoudi R, Ouertani H, Blouza I, Turki S, Khattech MB. Ridge augmentation with titanium mesh: A case report. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg* 2017;118:181-186.
31. Galgut P, Pitrola R, Waite I, Doyle C, Smith R. Histological evaluation of biodegradable and non-degradable membranes placed transcutaneously in rats. *J Clin Periodontol* 1991;18:581-586.

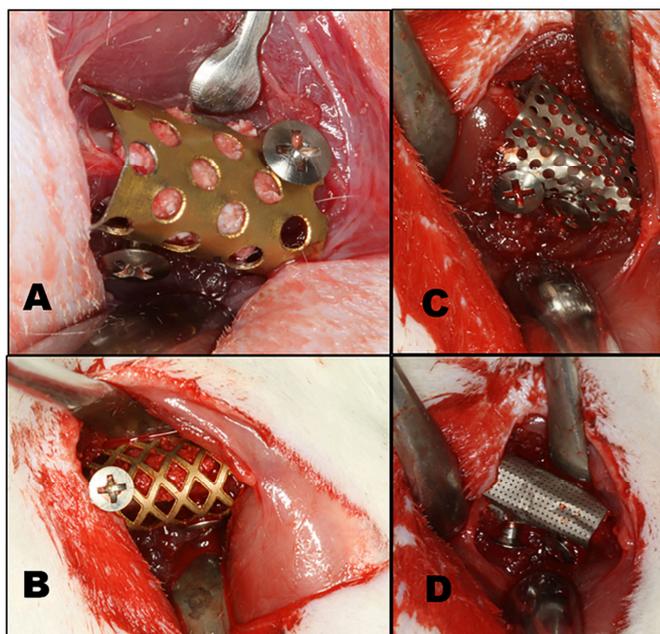


Figure 1 - Illustration images of titanium meshes fixed by screws. A – Group P175; B – Group P300; C – Group P85; D – Group P15.

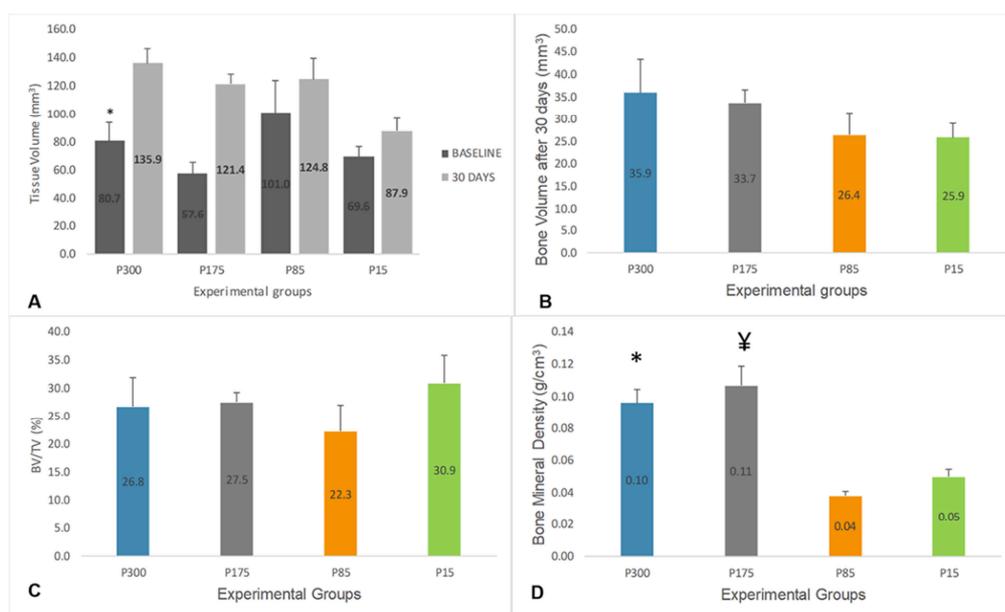


Figure 2 – Graphs demonstrating μ -CT results. A – Tissue volume (mm³) for all groups. Significant differences between P300 baseline and 30 days (Anova, Tukey, $p < 0.05$). In the other groups, no statistically significant differences were observed ($p > 0.05$). Bars represent averages and positive errors. Level of significance was considered 95% (Anova, Tukey). B – Bone volume (mm³) for all groups. No statistically significant differences were observed. Bars represent averages and positive errors. Level of significance was considered 95% (Anova, Tukey). C – Relation between bone volume and tissue volume (%). No statistically significant differences were observed. Bars represent averages and positive errors. Level of significance was considered 95% (Anova, Tukey). D – Bone mineral density (g/cm³). Significant differences between meshes pore size > 1 mm and meshes pore size < 1 mm (Anova, Tukey, $p < 0.05$). Bars represent averages and positive errors. Level of significance was considered 95% (Anova, Tukey).

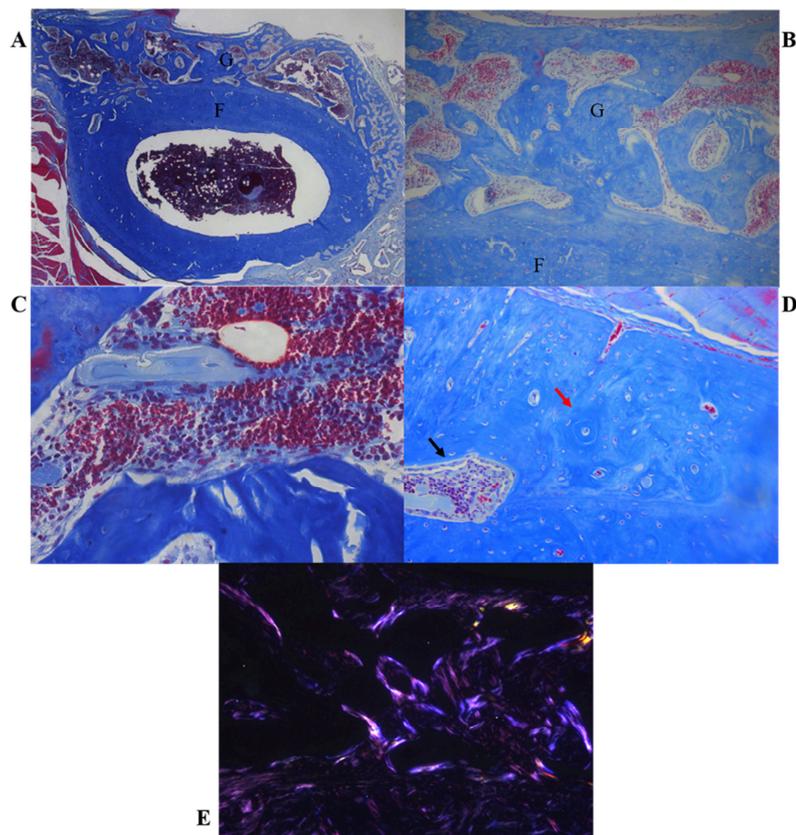


Figure 3 - Specimens of histological evaluation belonging to P300 Group. **A** - Overview of part of the femur (F) in contact with newly formed bone (G) (original magnification 2.5X). **B** - Visualization of BC/femur interface, in most central portion. (Original magnification 10X). **C** - Presence of disorganized connective tissue, blood cells and graft remnant (Original magnification 40X). **D** - Presence of osteoblasts aligned on new bone and graft surface (black arrow). Presence of osteocytes in gap and the beginning of maturation process with concentric lamellae formation (red arrow) (Original magnification 40X). **E** - Visualization of grafted area and femur under polarized light (original magnification 10X).

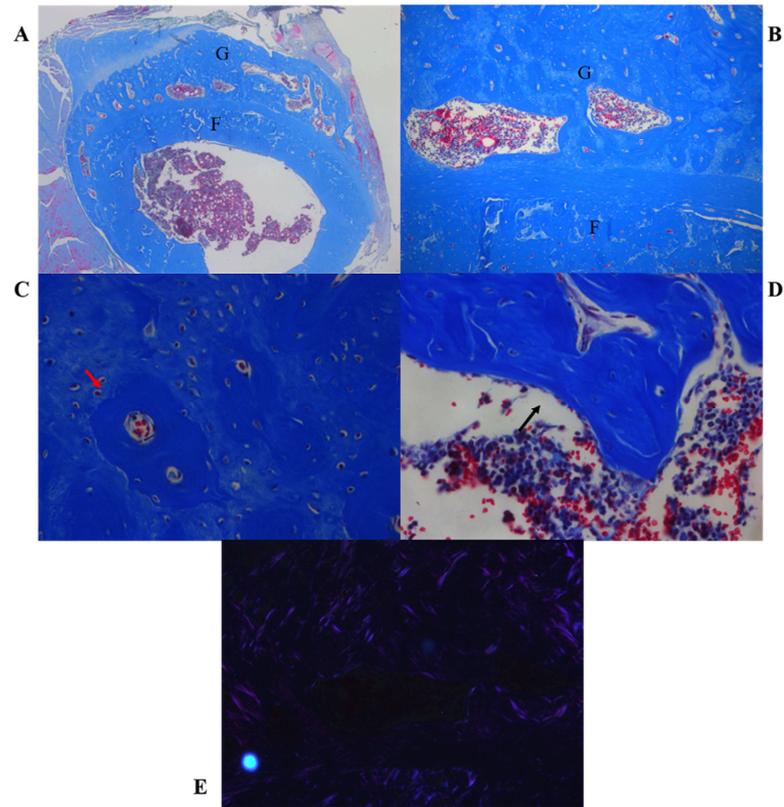


Figure 4 - Specimens of histological evaluation belonging to Group P175. **A** - Overview of part of the femur (F) in contact with newly formed bone (G) (original magnification 2.5X). **B** - Visualization of BC/femur interface, in most central portion. (Original magnification 10X). **C** - Presence of osteocytes in gap and the beginning of maturation process with concentric lamellae formation (red arrow) (Original magnification 40X). **D** - Presence of osteoblasts aligned on new bone and graft surface (black arrow), disorganized connective tissue and blood cells (Original magnification 40X). **E** - Visualization of grafted area and femur under polarized light (original magnification 10X).

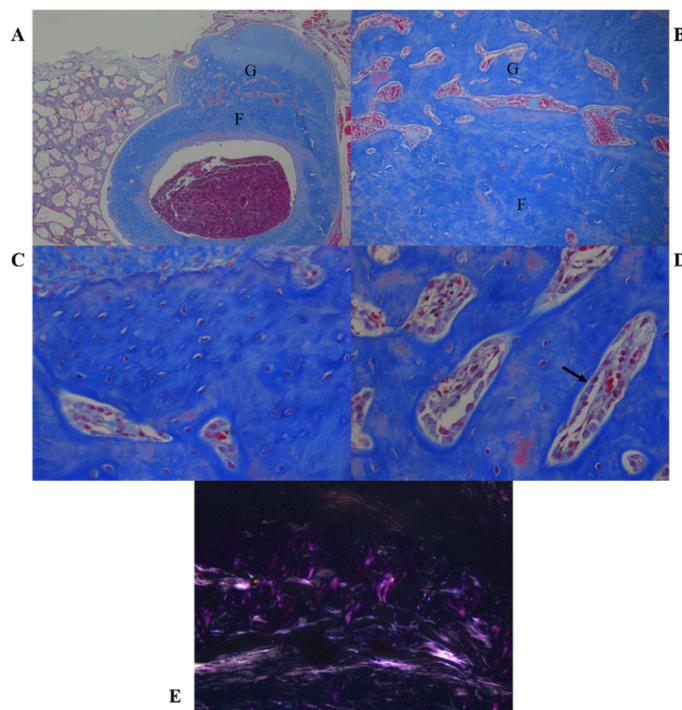


Figure 5 - Specimens of histological evaluation belonging to Group P85. **A** - Overview of part of the femur (F) in contact with newly formed bone (G) (original magnification 2.5X). **B** - Visualization of BC/femur interface, in most central portion. (Original magnification 10X). **C** - Presence of osteocytes in gap and the beginning of maturation process with concentric lamellae formation (red arrow) (Original magnification 40X). **D** - Presence of osteoblasts aligned on new bone and graft surface (black arrow), disorganized connective tissue and blood cells (Original magnification 40X). **E** - Visualization of grafted area and femur under polarized light (original magnification 10X).

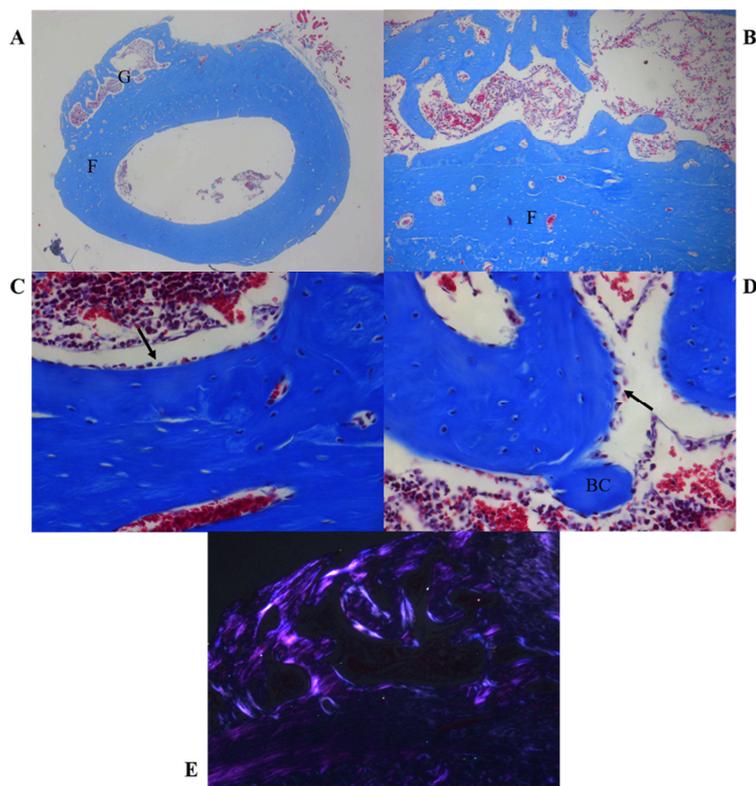


Figure 6 - Specimens of histological evaluation belonging to Group P15. **A** - Overview of part of the femur (F) in contact with newly formed bone (G) (original magnification 2.5X). **B** - Visualization of BC/femur interface, in most central portion. (Original magnification 10X). **C** - Presence of disorganized connective tissue, blood cells and graft remnant, and osteoblasts aligned on new bone and graft surface (black arrow) (Original magnification 40X). **D** - Presence of aligned osteoblasts (black arrows) and areas with absence of osteocytes, corresponding to graft remnants (BC) (Original magnification 40X). **E** - Visualization of grafted area and femur under polarized light (original magnification 10X).

ARTIGO 2

12/06/2018

ScholarOne Manuscripts

 Clinical Oral Implants Research

 Home

 Author

 Review

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Clinical Oral Implants Research

Manuscript ID

COIR-Jun-18-OR-6988

Title

Influence of collagen membrane on bone quality in titanium meshes reconstructions - study in rats

Authors

Borges, Cristine

de Oliveira, Paula

Soares, Mariana

Novaes Jr, Arthur B

Taba Jr, Marlo

Faria, Paulo

Date Submitted

27-Jun-2018

Influence of collagen membrane on bone quality in titanium meshes reconstructions - study in rats

Cristine D'Almeida Borges¹, Paula Gabriela Faciola Pessôa de Oliveira¹, Mariana Sales de Melo Soares¹, Arthur Belém Novas Jr.¹, Paulo Esteves Pinto Faria², Mário Taba Júnior¹

¹ Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo - Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

² Department of Odontology, University of Ribeirão Preto, Avenida Costábile Romano, 2201, CEP 14096-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Corresponding author:

Mario Taba, Jr. Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo - Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil; e-mail: mtaba@usp.br

Key words: bone regeneration, bone density, spongy bone.

Objective: evaluate if there was quality and new bone volume difference by using titanium meshes with different pore size and thicknesses.

Material and methods: Twenty-eight Wistar rats were randomly allocated into four main experimental groups, according to mesh pore size in μm : Group P300 (Neodent®; n = 7); Group P175 (Neodent®; n = 7); Group P85: (Bionnovation®; n = 7); Group P15: (Bionnovation®; n = 7). In all groups, each femur was subdivided into test and control: Test (T): Bio-Oss Collagen Geistlich® (BC) and collagen membrane (BioGide Geistlich®) were used; Control (C): only BC was used. *In vivo* computerized microtomography analysis were made at baseline and 30 days after surgery. Histologic analysis comprehends 30 days samples.

Results: No statistic difference between groups in bone volume ($p>0.05$). Meshes with pore size > 1 mm demonstrated higher mineral bone density, comparing to meshes with pore size < 1 mm ($p<0.05$), regardless collagen membrane. Also, formation of spongy bone in all experimental groups.

Conclusion: Additional use of collagen membrane on titanium mesh, associated with xenogen bone graft, did not determine formation of superior quality new bone.

Introduction

Dental implants are effective therapeutic options to replace missing teeth, but in cases of long-lasting edentulism, residual bone volume is often insufficient for optimal rehabilitation. Thus, restoration of bone volume has become necessary to achieve success in rehabilitation with implants (Rasia-dal Polo, Poli, Rancitelli, Beretta, & Maiorana, 2014). One of the techniques that allows gain and/or maintenance of bone tissue is guided bone regeneration (GBR), in which a mechanical barrier is positioned to prevent rapid fibroblasts proliferation, allowing defect osteoprogenitor cells to repopulate the area, initiating bone formation process (Dahlin, Linde, Gottlow, & Nyman, 1988; Hammerle & Karring, 1998; Hurley, Stinchfield, Bassett, & Lyon, 1959). GBR is recognized as an effective and predictable method to ensure bone formation and, in many cases, is associated with bone grafts or substitutes, which act as osteoconductors (Artzi, Dayan, Alpern, & Nemcovsky, 2003).

Studies comparing the best type of barrier to be used have been published in literature since the last 60 years. Occlusive membranes in association with bone graft material demonstrated a gain of bone tissue in several studies (Hammerle & Lang, 2001; Strietzel, Khongkhunthian, Khattiya, Patchanee, & Reichart, 2006; Zitzmann, Scharer, & Marinello, 2001; Zitzmann, Scharer, Marinello, Schupbach, & Berglundh, 2001). Absorbable membranes, for example, maintain a temporary barrier between 6 to 8 weeks (Bunyaratavej & Wang, 2001), and eliminate need for further surgical procedure for removal. However, it has been shown that occlusive membranes without titanium reinforcement, made from soft materials such as collagen membranes, tend to collapse in large reconstructions because they do not have adequate resistance to space maintenance (Rakhmatia, Ayukawa, Furuhashi, & Koyano, 2014), which is essential in vertical bone reconstructions (Hammerle & Jung, 2003).

Titanium mesh barriers have been shown that bone volume to be created can be planned prior to the surgical procedure and mesh can be molded to maintain volume during healing period without graft compression by the flap (Miyamoto, Funaki, Yamauchi, Kodama, & Takahashi, 2012). The presence of pores prevents soft tissue growth internally and allows interstitial fluid diffusion (Strietzel et al., 2006). Studies shows satisfactory results for bone reconstructions with titanium meshes (Eisig, Ho, Kraut, & Lalor, 2003; Gutta, Baker, Bartolucci, & Louis, 2009; Rakhmatia, Ayukawa, Furuhashi, & Koyano, 2013; Rakhmatia et al., 2014).

Up until present time, the ideal mechanical barrier for GBR remains in studies, aiming analyze factors such as, occlusivity, stability, ideal pore size, peripheral sealing between barrier and bone tissue, blood supply required and providing proliferation of osteoprogenitor cells (Shin, Herr, Kwon, & Chung, 2013). Some clinical and preclinical studies have demonstrated limited bone regeneration and soft tissue infiltration when occlusive membranes were not used in association to titanium mesh (Her, Kang, & Fien, 2012; Lim, Kim, et al., 2015; Park et al., 2008).

Lim et al. used titanium mesh after implant installation and, despite high exposure rate, authors did not observe bone regeneration in many samples, suggesting the additional use of occlusive membrane (Lim, Kim, et al., 2015). The presence of soft tissue layer below titanium mesh and lack of mineralization soft tissue evidence, demonstrates possibility on using occlusive membrane (Her et al., 2012; Louis, Gutta, Said-Al-Naief, & Bartolucci, 2008; Proussaefs & Lozada, 2006). Despite mechanical barrier need to obtain ROG criteria, good results were demonstrated through after use of different pore size titanium meshes (Artzi et al., 2003; Dupoirieux, Pourquier, Picot, & Neves, 2001; Lundgren, Sennerby, & Lundgren, 1998; Miyamoto et al., 2012; Proussaefs & Lozada, 2006; Rakhmatia et al., 2014; Zellin & Linde, 1996), which shows that results are inconclusive.

Thus, in the present study it was hypothesized that titanium mesh used in association with collagen membrane could favor bone regeneration with improvement in quality and bone volume, when used in conjunction with xenogenous bone graft. This study evaluated bone quality formed in rat femur after 30 days, through in vivo computerized microtomography and descriptive histological analysis.

Material and methods

1. Ethical aspects and financial support

Initially, this research project was sent to University of Ribeirão Preto ethics committee (CEP / UNAERP), which was duly approved and registered through code ComÉt: 15/2015.

2. Samples characterization

Twenty-eight male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) with an average weight of 410.8 grams were used in this study, all originated from UNAERP central laboratory. The animals were kept in appropriate plastic boxes with food and water *ad libitum* before and during experimental period, and remained in UNAERP's laboratory in a 12 hours cycle environment of light and temperature between 22 and 24°C.

2.1. Experimental groups

Animals were randomly allocated into four main experimental groups, according to titanium meshes use:

- Group P300: Neodent⁴⁸ titanium meshes, with 0.3 mm thickness and 3 mm pore size (n = 7);

⁴⁸ Neodent® - Grid Panel 20, diamond pore, Curitiba, PR, Brazil

- Group P175: Neodent⁴⁹ titanium meshes, with 0.3 mm thickness and 1.75 mm pore size (n = 7);
- Group P85: Bionnovation⁵⁰ titanium meshes, with 0.04 mm thickness and 0.85 mm pore size (n = 7);
- Group P15: Bionnovation⁵¹ titanium meshes. with 0.04 mm thickness and 0.15 pore size (n = 7).

In all groups, each femur was subdivided into test and control:

- Test (T): femur in which bovine bone graft associated with porcine collagen⁵² (BC) and collagen membrane⁵³ were used.
- Control (C): femur in which only BC was used.

To determine collagen membrane use, right and left femurs of each animal were randomized using the Microsoft Excel 14.0.7 program⁵⁴. Randomization was only revealed after opening surgical wound and complete visualization of femur.

3. Surgical Procedure

After weighing, animals received general anesthesia, obtained by the association of 0.08 ml / 100g of Ketamine Hydrochloride⁵⁵ and 0.04 ml / 100g of Xylazine Hydrochloride⁵⁶, via intramuscular injection. Subsequently, tricotomy was performed with electric cutter and then local asepsis using a 2% chlorhexidine solution.

⁴⁹ Neodent® - Grid Panel 20, circular pore, Curitiba, PR, Brazil

⁵⁰ Bionnovation® Surgitime Titanium, Bauru, SP, Brazil

⁵¹ Bionnovation® Surgitime Titanium, Bauru, SP, Brazil

⁵² Bio-Oss Collagen Geistlich® Pharma, São Paulo, SP, Brasil

⁵³ BioGide Geistlich® Pharma, São Paulo, SP, Brasil

⁵⁴ Microsoft® Corporation, Santa Rosa, California

⁵⁵ Agener União Ltda, São Paulo, SP, Brazil

⁵⁶ Rompum; Bayer SA, São Paulo, SP, Brazil

Initial incision was made parallel to long axis of the femur, in thigh outer portion, using # 3 scalpel handle, mounted with # 15 scalpel blade⁵⁷ (Figure 1A). The incision area was established by femur bulkier portion, through palpation. Muscle tissues were secluded until complete periosteum exposure.

After complete visualization of femur, three perforations were drilled with a 1.3 mm⁵⁸ attached at a 20: 1 angle⁵⁹ in 500 rpm under irrigation. Perforations did not reach bone marrow to avoid risk of fracture, just for delimit graft area (Figure 1B and C). Then each block of bone graft BC (Figure 1D) was equally divided into four samples, so that one BC was enough for four femurs. BC sample was then positioned over perforations and titanium mesh was positioned and fixed with two gingival screws of 5 mm high and 1.6 mm in diameter⁶⁰. In groups P300 and P175, screws were positioned on femur opposite sides (Figure 1E and G). In groups P85 and P15, screws were positioned only at the top of femur (Figure 1F and H). Following randomization, 10 mm x 15 mm collagen membrane was positioned above titanium mesh, only in femur test (Figure 1I). Surgical area was closed using absorbable sutures⁶¹.

After surgery, animals received a single intramuscular antibiotic dose of 24,000 IU / kg Penicillin G-benzathine⁶² at a dose of 0.01 ml per 100 g of the body weight and dipyrone 500 mg⁶³ in water. Twenty-four hours after surgical procedure, animals were anesthetized using the same anesthesia technique previously reported. Then, each animal was positioned for *in vivo* computerized microtomograph analysis, thus determining baseline analysis.

⁵⁷ Swann-Morton, Sheffield, England

⁵⁸ Neodent® Bone Graft Kit, São Paulo, SP, Brasil

⁵⁹ Konzept-Kavo®, Joinville, SC, Brazil

⁶⁰ Neodent® gingival screw, Curitiba, PR, Brazil

⁶¹ Vicryl Ethicon 5.0, Johnson Prod., São José dos Campos, Brazil

⁶² Small Porpoid Veterinary Pentabiotic, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brazil

⁶³ D-500, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brazil

Animals were kept in appropriate plastic boxes throughout 30-day experimental period. After this period, animals were anesthetized for *in vivo* computerized microtomography (μ -CT) analysis, determining 30 days analysis. At the end, animals were euthanized with intraperitoneal intraperitoneal⁶⁴ 150 mg / kg 2.5% sodium thiopentate intraperitoneal injection.

4. In vivo computerized microtomography

For images acquisition, SkyScan Model 1176 Microtomograph⁶⁵ was used. This device consists of a microfocus X-ray tube with high voltage source (65 kV, 382 μ A), resolution of 18 μ m, with copper aluminum filter, rotation step (0,7 / 360°) + 2x off-set camera and 1. Microtomographic analyzes of three - dimensional microarchitecture of graft and neoformed bone were performed. For image processing was used reconstruction software - NRecon v.1.6.9, Analysis Software - DataViewer version 1.4.1 and CTAn v.1.14.4 and 3D Navigation Software - CTVol v.2.2.

In vivo computerized microtomography analysis was performed 24 hours (baseline) and 30 days after surgical procedure. Baseline analysis aimed to capture BC initial volume and serve as reference for comparisons. All measurements were performed by a blind examiner. Titanium mesh and the gingival screws was used as reference to determine region of interest (ROI). Therefore, ROI is the cross-section area selected below titanium mesh (graft or neoformed bone tissue). Summing all collective ROIs, volume of interest (VOI) was obtained, representing a selected 3D volume. All volumetric measurements were performed in a VOI. Measurements of tissue volume (TV), bone volume (BV), % of bone formation (BV/TV) and bone mineral density (BMD) were used for analysis.

⁶⁴ Thiopentax, Cristália, Brazil

⁶⁵ Bruker-microCT SkyScan, Kontich, Belgium

5. Histological processing

After euthanasia, right and left femurs were fixed in 10% neutral formalin for 48 hours. Decalcification was carried out by means of 10% ethylenediaminetetraacetic acid solution (pH = 7.0, EDTA), with changes from two to three times a week, for an average period of 60 days, until complete decalcification. Then, samples were washed in running water for 24 hours. In each sample, screw and titanium mesh were removed without damaging surrounding tissues. Dehydration and diaphanization process was started, through successive baths in increasing alcohols and xylol series. After paraffin inclusion, serial sections 5 μm thick were obtained from the most central point of the graft area, using electronic microtome⁶⁶. Harris Hematoxylin and Mason Trichrome technique was used for staining.

5.1. Histological analyzes

Sections were analyzed under light microscopy for evaluation of bone quality. Images were captured by a Leica DC 300F camcorder⁶⁷ coupled to a Leica MZFL III stereomicroscope⁶⁸. In a descriptive way, cellular pattern and remaining biomaterial were evaluated.

5.1.1. Characterization of bone type

Bone type definition was determined by image analysis, captured with 2.5X magnification objective. For new bone quantification, a computerized grid measuring 2 cm X 2 cm and containing six columns and six lines was used. The presence of bone formation was determined by intersection points (%) between horizontal and vertical lines. These measures were made at three points: at both peripheral and at the most central point. The final percentage was determined as average.

⁶⁶ Microm HM 335E, SA®, Germany

⁶⁷ Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany

⁶⁸ Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany

5.1.2. Measurement of BC/femur interface

Using a 10X magnification objective image, newly formed bone/femur interface was measured in central region of the grafted area, which was considered representative. For this, Image J program⁶⁹ was used.

6. Analysis of results

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 7 statistical program⁷⁰. Microtomographic data and histological measurements of bone type and BC/femur interface were compared between groups through ANOVA two criteria test, with Tukey post test. A significance level of 5% was used for all statistical analyzes.

Results

Surgical procedure occurred with some interurrences. Group P175 and P85 lost two animals in each group. P15 group lost one animal, totaling 23 animals in the experiment. Excluded animals were euthanized because of fractures or because they became weakened during healing period. In this way, experimental groups presented sample number as: group P300 - N = 7; Group P175 -N = 5; Group P85 -N = 5; Group P15 - N = 6.

1. Volumetric measurements

For better compression, numerical values were distributed in graphs for each three-dimensional parameter evaluated (Figure 2A, B and C). Initially, a lower tissue graft volume was observed in the P300 and P175 groups. After the 30-day period, tissue volume was similar in all groups. In all volumetric parameters after 30 days, no statistically significant differences were observed.

⁶⁹ National Institutes of Health, Bethesda, USA

⁷⁰ GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA

In relation to BMD after 30 days, denser tissue was observed in the titanium meshes with pore size > 1 mm ($p < 0.05$), with mean and standard deviation of 0.1 ± 0.03 and 0.11 ± 0.02 in control femur, and 0.01 ± 0.03 and 0.10 ± 0.02 in test femur, for groups P300 and P175 respectively (Figure 2D).

Tridimensional reconstructions demonstrated titanium meshes, screws and bone graft set at baseline and 30 days (Figures 3, 4, 5 and 6).

2. Histological analysis

2.1. Histological description

Bone neoformation pattern was similar in all groups. It was observed presence of bone formation, mainly in peripheral graft area region, besides spaces with absence of bone formation, corresponding to disorganized connective tissue and blood cells. In addition, presence of isolated osteoclasts, osteocytes in gaps, empty gaps corresponding to remnant graft, osteoblasts aligned on new bone surface and graft (Figure 7).

2.2. Bone type analysis

According to results, percentage of non-mineralized areas were 37 ± 18.8 , 40.5 ± 15.9 , 45.1 ± 10.9 , 33.3 ± 7.1 for control femur; 42.9 ± 9.5 , 31.7 ± 10 , 45 ± 21.12 , 45.3 ± 26.8 for test femur, at P300, P175, P85 and P15, respectively. No statistically significant differences were observed in intergroup comparisons.

Discussion

In this present study, four types of titanium mesh were associated with bone graft and collagen membrane in order to evaluate additional use of occlusive membrane influence in titanium mesh's reconstructions. The model used in the study was a rat femur, due to greater disposition in adapt titanium meshes. In addition, exophytic bone formation model, to gain

bone tissue out of skeletal framework, was used as opposed to bone formation surrounded by defect walls or alveoli. Thus, new bone tissue was formed over the outer surface of femur, without creating a defect.

The collagen membrane used in the present study is absorbable, composed of type I and III porcine collagen, in a double layer. The inner surface, facing bone tissue, consists of disorganized collagen fibers, which allow osteoblasts proliferation. The outer surface facing soft tissue is dense and prevents fibroblasts proliferation (Zitzmann, Naef, & Scharer, 1997). In vivo study in rat femur demonstrated that membrane absorption process is initiated after 4 weeks and completed after 6 weeks (Bunyaratavej & Wang, 2001).

It was suggested that occlusive barrier uses in association with titanium meshes could minimize soft tissue formation in bone defect, aiming acquire a biomaterial or combination of biomaterials that would allow bone tissue formation of better quality. Shin et al. evaluated the effect of using collagen membrane in conjunction with 50 μm titanium mesh and allogeneic bone graft in rabbit calvaria GBR. After 8-week histomorphometric analysis, authors observed new bone formation of $10.81\% \pm 5.38\%$ and $15.16\% \pm 6.76\%$ in groups without and with collagen membrane, respectively, and did not find statistically significant differences (Shin et al., 2013). Our results showed similarities with the authors. In test femurs, percentage of bone formation was observed, ranging from 18.3% to 30.5%; in control femurs, variation was observed from 22.3% to 30.9%, according to mesh pore size. Likewise, no statistical differences were observed in intra- and inter-group comparisons. In spite of different analyzes and numerical percentage of new bone formed, our results are compatible with previous results, suggesting that in bone graft presence, use of collagen membrane does not interfere final bone volume.

On the other hand, Lim et al. compared use of titanium mesh alone and in association with collagen membrane, without bone graft. They observed that below titanium mesh, there

was dense fibrous tissue when membrane was not used. Also, authors observed mesh exposure (Lim, Lee, Choi, & Jung, 2015). These results are not in agreement with Shin et al. and our results, probably due to experimental model difference and presence of bone graft, which was recommended in previous studies after demonstration of decrease in new bone formation (Shin et al., 2013).

Bone graft used in this study is composed by a combination of inorganic bovine bone particles and a purified collagen matrix at 9: 1 (BC). When compared to β -tricalcium phosphate for GBR with collagen membrane in rat calvaria, BC demonstrated small amount of new bone formed besides presence of structures similar to bone tissue, but without osteocytes, suggesting to be grafts remnants. They also observed that, after 10 weeks, BC did not develop complete closure of defect (Kato, Lemler, Sakurai, & Yamada, 2014). Araújo et al. observed similar results and identified 40% filling with new bone, after 4 weeks, in dogs alveoli grafted with BC (Araujo, Liljenberg, & Lindhe, 2010).

After histological analysis, our results showed that percentage of non-mineralized areas in ranged from 33.3% to 45.1%. According to Bonucci (Bonucci, 2000), the main difference between compact and spongy bone depends on its porosity. The percentage of voids related to osteon channels, osteocyte canaliculi and Volkmann channels will determine this porosity. In compact bones, voids range from 5 to 30%. If presence of voids is greater than 30%, bone may be characterized as spongy, with density ranging from 0.1 to 0.9 g / cm³. Results of BMD and percentage of non-mineralized areas suggest that new bone type was spongy for all groups, regardless collagen membrane. In addition, gaps of empty osteocytes were also observed, suggesting remaining graft after 30 days, according to Kato et al. (Kato et al., 2014).

In relation to BMD, it was observed that meshes with larger pore size presented higher density, and difference was statistically significant. Studies suggested that titanium meshes

with larger pore size would have a lower mineral density, different from demonstrated by our results (Rakhmatia et al., 2014). Numerically, they observed density between 8 and 10 g/cm³ in meshes with pore size between 20 and 100 µm. Our values ranged from 0.04 to 0.11 g / cm³, and in P300 and P175 meshes density was 0.10 and 0.11 g / cm³ (control), respectively, and 0.11 g / cm³ in both test femur. However, considering bone graft characteristics, reduced BMD and absence of complete filling of graft area may be related to newly formed BC pattern.

This present study demonstrated limitations in relation to thinner meshes stabilization, which may have suffered interference during animal movement. Despite limitations, we can suggest that additional use of collagen membrane on titanium mesh, associated with xenogen bone graft, did not determine formation of superior quality new bone. Additionally, it can be observed that bone tissue pattern formed when using BC in this experimental model, is the predominance of spongy or trabecular bone. It is suggested that, in defect walls presence, such as dental alveoli, graft should demonstrate higher bone density. Further studies should be developed for better understanding.

Acknowledgement and Conflict of Interest: This study received financial assistance through biomaterials donation from the following companies: Neodent®, Geistlich® Pharma and Bionnovation® Biomedical. Study sponsors had no involvement in study design, analysis, interpretation data and manuscript writing.

References

- Araujo, M. G., Liljenberg, B., & Lindhe, J. (2010). Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*, 21(1), 55-64. doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01854.x
- Artzi, Z., Dayan, D., Alpern, Y., & Nemcovsky, C. E. (2003). Vertical ridge augmentation using xenogenic material supported by a configured titanium mesh: clinicohistopathologic and histochemical study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 18(3), 440-446.
- Bonucci, E. (2000). Basic composition and structure of bone. In D. R. An YH (Ed.), *Mechanical testing of bone and the bone-implant interface* (pp. 3-22): CRC Press.
- Bunyaratavej, P., & Wang, H. L. (2001). Collagen membranes: a review. *J Periodontol*, 72(2), 215-229. doi:10.1902/jop.2001.72.2.215
- Dahlin, C., Linde, A., Gottlow, J., & Nyman, S. (1988). Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg*, 81(5), 672-676.
- Dupoirieux, L., Pourquier, D., Picot, M. C., & Neves, M. (2001). Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 30(1), 58-62. doi:10.1054/ijom.2000.0011
- Eisig, S. B., Ho, V., Kraut, R., & Lalor, P. (2003). Alveolar ridge augmentation using titanium micromesh: an experimental study in dogs. *J Oral Maxillofac Surg*, 61(3), 347-353. doi:10.1053/joms.2003.50064
- Gutta, R., Baker, R. A., Bartolucci, A. A., & Louis, P. J. (2009). Barrier membranes used for ridge augmentation: is there an optimal pore size? *J Oral Maxillofac Surg*, 67(6), 1218-1225. doi:10.1016/j.joms.2008.11.022
- Hammerle, C. H., & Jung, R. E. (2003). Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontol 2000*, 33, 36-53.
- Hammerle, C. H., & Karring, T. (1998). Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontol 2000*, 17, 151-175.
- Hammerle, C. H., & Lang, N. P. (2001). Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. *Clin Oral Implants Res*, 12(1), 9-18.
- Her, S., Kang, T., & Fien, M. J. (2012). Titanium mesh as an alternative to a membrane for ridge augmentation. *J Oral Maxillofac Surg*, 70(4), 803-810. doi:10.1016/j.joms.2011.11.017
- Hurley, L. A., Stinchfield, F. E., Bassett, A. L., & Lyon, W. H. (1959). The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. *J Bone Joint Surg Am*, 41-A, 1243-1254.
- Kato, E., Lemler, J., Sakurai, K., & Yamada, M. (2014). Biodegradation property of beta-tricalcium phosphate-collagen composite in accordance with bone formation: a comparative study with Bio-Oss Collagen(R) in a rat critical-size defect model. *Clin Implant Dent Relat Res*, 16(2), 202-211. doi:10.1111/j.1708-8208.2012.00467.x
- Lim, H. C., Kim, M. S., Yang, C., Lee, J. S., Hong, J. Y., Choi, S. H., & Jung, U. W. (2015). The Effectiveness of a Customized Titanium Mesh for Ridge Preservation with Immediate Implantation in Dogs. *Clin Implant Dent Relat Res*, 17 Suppl 2, e652-660. doi:10.1111/cid.12302
- Lim, H. C., Lee, J. S., Choi, S. H., & Jung, U. W. (2015). The effect of overlaying titanium mesh with collagen membrane for ridge preservation. *J Periodontal Implant Sci*, 45(4), 128-135. doi:10.5051/jpis.2015.45.4.128
- Louis, P. J., Gutta, R., Said-Al-Naief, N., & Bartolucci, A. A. (2008). Reconstruction of the maxilla and mandible with particulate bone graft and titanium mesh for implant placement. *J Oral Maxillofac Surg*, 66(2), 235-245. doi:10.1016/j.joms.2007.08.022
- Lundgren, A. K., Sennerby, L., & Lundgren, D. (1998). Guided jaw-bone regeneration using an experimental rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 27(2), 135-140.

- Miyamoto, I., Funaki, K., Yamauchi, K., Kodama, T., & Takahashi, T. (2012). Alveolar ridge reconstruction with titanium mesh and autogenous particulate bone graft: computed tomography-based evaluations of augmented bone quality and quantity. *Clin Implant Dent Relat Res*, 14(2), 304-311. doi:10.1111/j.1708-8208.2009.00257.x
- Park, S. H., Lee, K. W., Oh, T. J., Misch, C. E., Shotwell, J., & Wang, H. L. (2008). Effect of absorbable membranes on sandwich bone augmentation. *Clin Oral Implants Res*, 19(1), 32-41. doi:10.1111/j.1600-0501.2007.01408.x
- Proussaefs, P., & Lozada, J. (2006). Use of titanium mesh for staged localized alveolar ridge augmentation: clinical and histologic-histomorphometric evaluation. *J Oral Implantol*, 32(5), 237-247. doi:10.1563/1548-1336(2006)32[237:UOTMFS]2.0.CO;2
- Rakhmatia, Y. D., Ayukawa, Y., Furuhashi, A., & Koyano, K. (2013). Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *J Prosthodont Res*, 57(1), 3-14. doi:10.1016/j.jpjor.2012.12.001
- Rakhmatia, Y. D., Ayukawa, Y., Furuhashi, A., & Koyano, K. (2014). Microcomputed tomographic and histomorphometric analyses of novel titanium mesh membranes for guided bone regeneration: a study in rat calvarial defects. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 29(4), 826-835. doi:10.11607/jomi.3219
- Rasia-dal Polo, M., Poli, P. P., Rancitelli, D., Beretta, M., & Maiorana, C. (2014). Alveolar ridge reconstruction with titanium meshes: a systematic review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 19(6), e639-646.
- Shin, S. I., Herr, Y., Kwon, Y. H., & Chung, J. H. (2013). Effect of a collagen membrane combined with a porous titanium membrane on exophytic new bone formation in a rabbit calvarial model. *J Periodontol*, 84(1), 110-116. doi:10.1902/jop.2012.110241
- Strietzel, F. P., Khongkhunthian, P., Khattiya, R., Patchanee, P., & Reichart, P. A. (2006). Healing pattern of bone defects covered by different membrane types--a histologic study in the porcine mandible. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 78(1), 35-46. doi:10.1002/jbm.b.30452
- Zellin, G., & Linde, A. (1996). Effects of different osteopromotive membrane porosities on experimental bone neogenesis in rats. *Biomaterials*, 17(7), 695-702.
- Zitzmann, N. U., Naef, R., & Scharer, P. (1997). Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 12(6), 844-852.
- Zitzmann, N. U., Scharer, P., & Marinello, C. P. (2001). Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 16(3), 355-366.
- Zitzmann, N. U., Scharer, P., Marinello, C. P., Schupbach, P., & Berglundh, T. (2001). Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: a histologic study in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 21(3), 288-295.

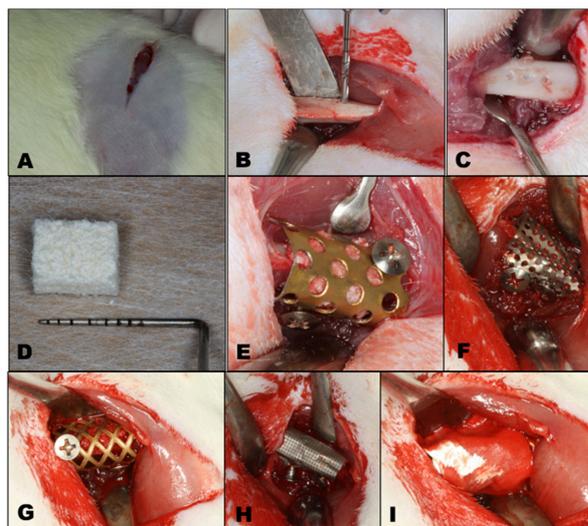


Figure 1 - Illustration images of surgical procedure. A – initial incision; B, C – perforations in femur; D – Bio-Oss Collagen; E – Group P175 titanium mesh; F – Group P 300 titanium mesh; G – Group P85 titanium mesh; H – Group P15 titanium mesh; I – Collagen membrane above titanium mesh.

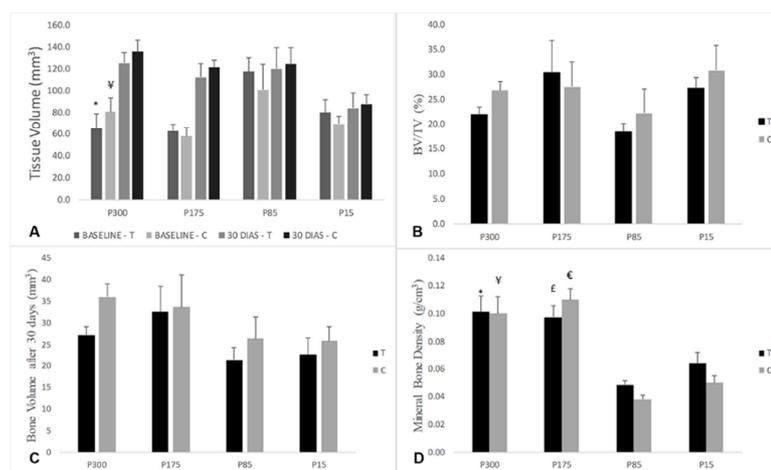


Figure 2 – Graphs demonstrating μ -CT results. **A** – Tissue volume (mm^3) for all groups. Significant differences between P300 baseline and 30 days, in control (*) and test (¥) femur (Anova, Tukey, $p < 0.05$). In the other groups, no statistically significant differences were observed ($p > 0.05$). Bars represent averages and positive errors. Level of significance was considered 95% (Anova, Tukey). **B** – Relation between bone volume and tissue volume (%). No statistically significant differences were observed. Bars represent averages and positive errors. Level of significance was considered 95% (Anova, Tukey). **C** - Bone volume (mm^3) for all groups. No statistically significant differences were observed. Bars represent averages and positive errors. Level of significance was considered 95% (Anova, Tukey). **D** – Bone mineral density (g/cm^3). Significant differences between meshes pore size $> 1\text{mm}$ and meshes pore size $< 1\text{mm}$ (Anova, Tukey, $p < 0.05$). Bars represent averages and positive errors. Level of significance was considered 95% (Anova, Tukey). (£) Statistical differences between P300-T X P85-T, P85-C e P15-C; (€) Statistical differences between P300-C X P85-T, P85-C e P15-C; (*) Statistical differences between P175-T X P85-T, P85-C e P15-C; (¥) Statistical differences between P175-C X P85-T, P85-C, P15-T, P15-C. T: Test, C: Control.

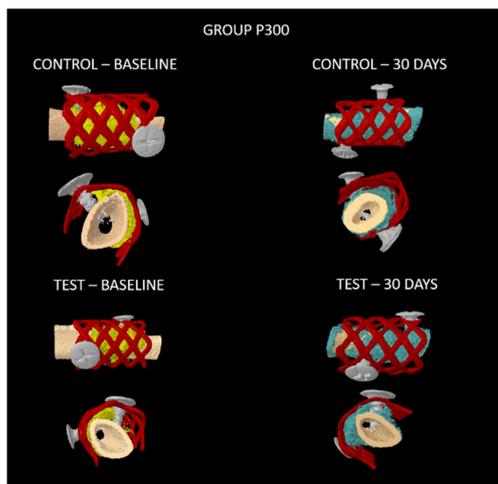


Figure 3 – Group P300 tridimensional reconstruction.

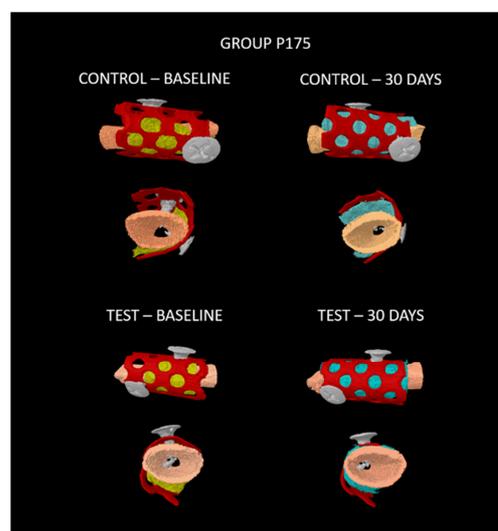


Figure 4 – Group P175 tridimensional reconstruction.

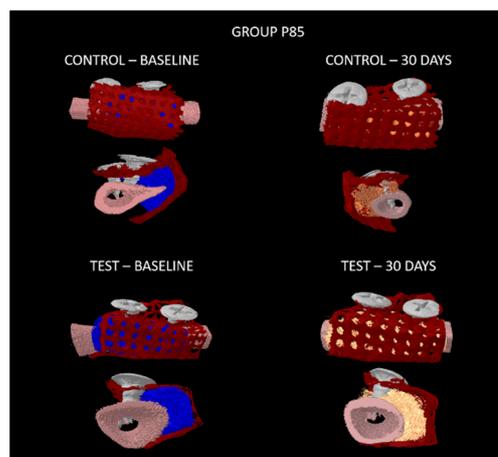


Figure 5 – Group P85 tridimensional reconstruction.

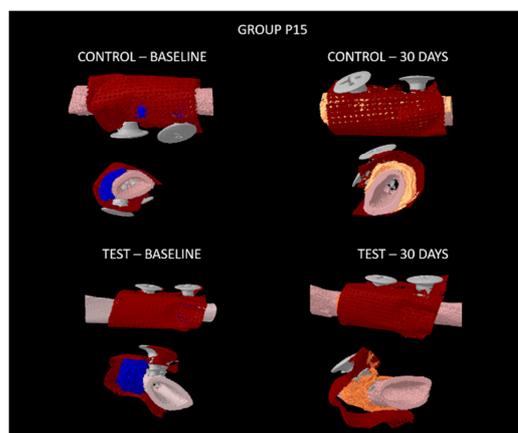


Figure 6 - Group P15 tridimensional reconstruction.

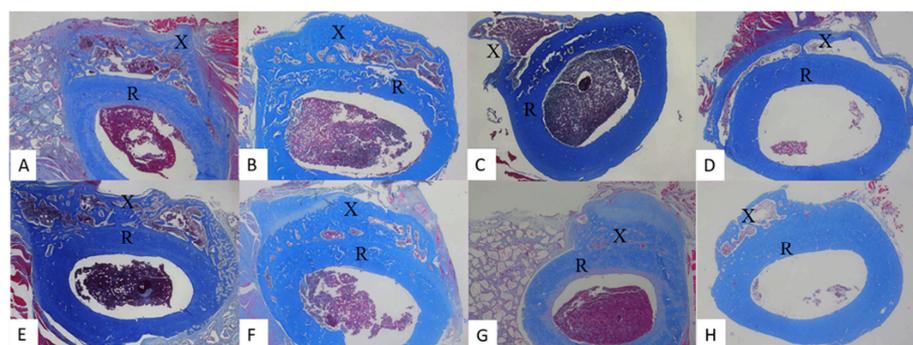


Figure 7 – Histologic samples. **A** – Bone formation in Group P300, femur test; **B** - Bone formation in Group P175, femur test; **C** - Bone formation in Group P85, femur test; **D** - Bone formation in Group P15, femur test; **E** - Bone formation in Group P300, femur control; **F** - Bone formation in Group P175, femur control; **G** - Bone formation in Group P85, femur control; **H** - Bone formation in Group P15, femur control. For all images, original magnification of 2.5X. X: grafted area; R: femur.