

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CTBMF  
MESTRADO

ROBERTA WEIRICH MOTTIN

**ANÁLISE DO REPARO DE DEFEITOS  
ÓSSEOS PREENCHIDOS COM  
B-TRIFOSFATO DE CÁLCIO ASSOCIADO A  
IMPLANTES DE TITÂNIO PURO.**

Prof. Dr. Claiton Heitz

Orientador

Porto Alegre  
2009

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CTBMF

ROBERTA WEIRICH MOTTIN

**ANÁLISE DO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS PREENCHIDOS COM  
B- TRI FOSFATO DE CÁLCIO ASSOCIADO A IMPLANTES DE TITÂNIO PURO**

Porto Alegre

2009

ROBERTA WEIRICH MOTTIN

**ANÁLISE DO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS PREENCHIDOS COM  
B- TRI FOSFATO DE CÁLCIO ASSOCIADO A IMPLANTES DE TITÂNIO PURO**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Claiton Heitz

Coordenador: Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

Porto Alegre

2009

ROBERTA WEIRICH MOTTIN

**ANÁLISE DO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS PREENCHIDOS COM  
B- TRI FOSFATO DE CÁLCIO ASSOCIADO A IMPLANTES DE TITÂNIO PURO**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Aprovado em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. Claiton Heitz

---

Prof. Dr. João Batista Burzlaff

---

Prof. Dr. João Julio da Cunha Filho

---

Ao meu marido, Paulo, pelo  
amor, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos.  
Aos meus pais, Vera e Miguel, e à minha irmã Gabriela, por tudo que representam  
para mim.  
Dedico a vocês esta conquista.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Claiton Heitz** por toda paciência, tranqüilidade e ensinamentos durante todo o curso de Mestrado.

Ao Prof. Dr. **João Batista Burzlaff** pela pronta disponibilidade em contribuir com este trabalho. Sua ajuda foi fundamental!

A colega **Juliana Goelzer** pelo auxílio na fase experimental deste trabalho e por sua amizade durante esses dois anos de ótima convivência.

A **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)** e a **CAPES** pelo incentivo e fomento à pesquisa.

## RESUMO

A necessidade de restabelecimento da forma e da função de estruturas ósseas perdidas por patologias, traumas ou iatrogenias tem sido amplamente estudada. As pesquisas têm procurado desenvolver novos materiais com o intuito de recuperar ou manter volume e qualidade óssea em regiões que perderam suas conformações anatômicas adequadas, sendo os biomateriais uma alternativa viável como substitutos ósseos. O grânulo  $\beta$ -trifosfato de cálcio ( $\beta$ -TCP) é um composto inorgânico que combina a propriedade de biodegradabilidade ativa com a osteocondutividade. O presente trabalho tem como objetivo fazer uma análise histológica descritiva do reparo de defeitos ósseos preenchidos com  $\beta$ -TCP associado a implantes de titânio puro, em cavidades confeccionadas em calotas cranianas de ratos. Foram selecionados randomicamente 18 ratos, machos adultos e a seguir divididos em três grupos de seis ratos cada, de acordo com o período de morte: 15, 30 e 60 dias. Na calota craniana de cada rato foram confeccionados quatro defeitos ósseos preenchidos com: (a)  $\beta$ -TCP, (b) coágulo, (c)  $\beta$ -TCP + parafuso de titânio puro e (d) parafuso de titânio puro. As amostras foram cortadas e avaliadas histologicamente. Foi analisada a presença e volume de tecido conjuntivo frouxo e de tecido ósseo imaturo, bem como a presença ou ausência de material remanescente ( $\beta$ -TCP) no defeito. Verificou-se a aceleração do processo de neoformação óssea na presença do  $\beta$ -TCP. Os resultados sugerem a biocompatibilidade e osteocondutividade do biomaterial, mesmo quando associado a implantes de titânio puro.

Palavras-chave: Biomateriais. Fosfatos de cálcio. Reparo. Defeitos.

## ABSTRACT

Concerning the necessity of form and function restoration from bone structures which had been lost through pathologies, traumas or iatrogenicity has been widely studied. The researches have been trying to develop new materials in order to recover or maintain the bone volume as well as quality into regions which have lost their proper anatomic conformations, being biomaterials the most suitable ones as a viable alternative as bone substitutes.  $\beta$ -tricalcium phosphate granule ( $\beta$ -TCP) is an inorganic composite which combines active biodegradability with osteoconductivity properties. The present study aims to develop a histological descriptive analysis on the repair of bone defects filled with  $\beta$ -TCP associated to pure titanium implants into cavities prepared in the calvarium bone of rats. Eighteen male adult rats were randomly selected and divided into three groups of six rats each, according to their period of death: 15, 30 and 60 days. Four bone defects were made into the calvarium bone of the rats and filled with: (a)  $\beta$ -TCP, (b) clot, (c)  $\beta$ -TCP + pure titanium screw and (d) pure titanium screw. The samples were cut and histologically evaluated. The analysis moved through the presence and volume of connective tissue and newly formed bone, as well as the presence or absence of remaining material ( $\beta$ -TCP) into the defect. It was verified an acceleration of the new bone formation process in the presence of  $\beta$ -TCP. The results suggest the biocompatibility and osteoconductivity of the biomaterial, even when associated to pure titanium implantes.

Key-words: Biomaterials. Calcium. Phosphate. Defects.



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	10
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	OBJETIVO GERAL .....	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	13
3.1	POPULAÇÃO E AMOSTRA .....	13
3.2	INSTALAÇÕES.....	13
3.3	MATERIAL EXPERIMENTAL .....	14
3.4	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	14
3.5	MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DA PEÇA OPERATÓRIA .....	15
3.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	16
4	ARTIGO .....	18
5	DISCUSSÃO GERAL .....	33
6	REFERÊNCIAS.....	34
	ANEXOS .....	36

## 1 INTRODUÇÃO

A necessidade de restabelecimento da forma e da função de estruturas ósseas perdidas por patologias, traumas ou iatrogenias tem sido amplamente estudada. As pesquisas têm procurado desenvolver novos materiais com o intuito de recuperar ou manter volume e qualidade óssea em regiões que perderam suas conformações anatômicas adequadas (Merten et al, 2001; Ng et al, 2006; Grandi, 2007 ).

O preenchimento ósseo de defeitos é facilitado pela osteocondução, que se caracteriza pela produção de um novo osso por meio da proliferação e da migração de células osteocompetentes ao longo de um condutor (Schenk, 1996; Marx e Stevens, 1997).

Na presença de um defeito ósseo, o osso pode ser completamente reconstituído através da reativação dos processos que ocorrem na embriogênese. Imediatamente após a ocorrência do defeito, forma-se um coágulo e uma rede de fibrina que preenche o espaço do defeito. Células inflamatórias migram para o local e liberam mediadores químicos e fatores de crescimento capazes de ativar as células osteoprogenitoras e de revestimento ósseo. A neoformação óssea estará na dependência de uma ampla rede vascular e de estabilidade mecânica dos fragmentos ósseos (Carvalho e Busato, 2005).

Métodos clássicos de reparo ósseo utilizam enxertos autólogos e homólogos, que possuem propriedades osteoindutoras e osteocondutoras. Entretanto, seu uso está associado à disponibilidade limitada das áreas doadoras e morbidade no caso dos enxertos autógenos, além de incompatibilidade imunológica nos enxertos homólogos (Jensen et al., 2006; Yamada et al., 2006; Isaac et al., 2007).

Substitutos ósseos sintéticos, como a hidroxiapatita e o trifosfato de cálcio foram desenvolvidos a partir da composição mineral do osso. Tais materiais possuem propriedades de cicatrização óssea satisfatórias, entretanto, são usualmente duros e quebradiços, possuem baixa resistência ao impacto e baixa força tênsil (Les Geros e Les Geros, 1988; Li et al., 2007). Os osteocondutores, como o trifosfato de cálcio, não têm a capacidade de induzir a citodiferenciação de osteoblastos, mas preenchem o defeito, orientando as novas células originadas por

proliferação de células osteoprogenitoras das bordas do defeito a promoverem a neoformação de tecido ósseo (Cook e Rueger, 1996; Keating e McQueen, 2001).

As cerâmicas de fosfato de cálcio reúnem uma série de vantagens que permitem seu uso como preenchimento e substituto de partes danificadas do sistema ósseo, tais como: mínima cavidade de preenchimento, preparação realizada durante o ato cirúrgico, fácil manipulação, ótimo contato entre osso e implante, biocompatibilidade, osteocondutividade e bioatividade. (Yuan et al., 2001; Santos, 2002; Yamada et al., 2006).

O grânulo  $\beta$ -TCP é um composto inorgânico que combina a propriedade de biodegradabilidade ativa com a osteocondutividade, sendo que o processo de biodegradação é o mesmo que induz a neoformação óssea (Driesens, 1998). Idealmente, o material usado em osteocondução deveria permitir uma deposição óssea direta em sua superfície e ser gradativamente substituído por este tecido ósseo. Por definição, somente os materiais bioativos estabelecem ligações químicas com o osso. O  $\beta$ -TCP mostra significativa atividade osteogênica na presença de células maduras (Shiratori et al., 2005).

O titânio é conhecido por ser um material biocompatível e usado com sucesso na odontologia e ortopedia. Entretanto, a condução óssea ao redor do titânio é inferior a que ocorre ao redor das cerâmicas bioativas como o fosfato de cálcio (Hanawa et al., 1997). Em seu estudo, Veeck et al. (1999) concluíram que a lâmina de titânio puro mostrou-se um material biocompatível, mas não osteocondutor, quando em contato com a medula óssea.

A utilização de biomateriais como o  $\beta$ -TCP associado a implantes de titânio comercialmente puros visa obter uma rápida formação de novo osso em contato com implante em um curto período de tempo pós-implantação, bem como adaptar as propriedades mecânicas dos metais às propriedades de cicatrização óssea dos biomateriais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo fazer uma análise histológica do reparo de defeitos ósseos preenchidos com  $\beta$ -trifosfato de cálcio associado a implantes de titânio puro.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Fazer uma análise histológica descritiva do reparo de defeitos ósseos confeccionados em calotas cranianas de ratos e preenchidos com:

- a)  $\beta$ -trifosfato de cálcio associado ao coágulo sanguíneo presente no defeito.
- b) Parafuso de titânio puro.
- c)  $\beta$ -trifosfato de cálcio em contigüidade ao parafuso de titânio puro.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (protocolo CEUA 08/00065). Foi realizado respeitando os Princípios Éticos em Experimentação Animal e a lei nº 6.638 que estabelece normas para a prática didático-científico da vivisseccção de animais e que determina outras providências.

A pesquisa realizou-se junto ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (CTBMF). Foi desenvolvido no *design* de estudo do tipo experimental verdadeiro, duplo cego, com amostras selecionadas de forma aleatória, com grupo controle e pós-teste.

#### 3.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Um total de 18 ratos machos, adultos, da espécie *Rattus Norvegicus*, linhagem *Wistar*, com peso médio de 280 a 320 g foi utilizado neste estudo. Os ratos foram divididos randomicamente em três grupos de seis ratos cada, de acordo com o período de morte (15, 30 e 60 dias). Na calota craniana de cada animal foram confeccionados quatro defeitos (Fig.1- Anexo), sendo que cada um deles representa um grupo: a) Grupo  $\beta$ - TCP; b) Grupo Coágulo (Controle); c) Grupo  $\beta$ -TCP + Parafuso de titânio; d) Grupo Parafuso de titânio.

#### 3.2 INSTALAÇÕES

O experimento foi realizado no laboratório de Farmacologia Aplicada da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), na cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. Os ratos foram mantidos no Vivário

da Faculdade de Farmácia da PUCRS, sala 108. Durante todo o experimento, os animais ficaram alojados sob condições satisfatórias, em estante ventilada fechada com entrada e saída de ar filtrado, controle de temperatura, umidade e sob luz fria. Receberam ração do tipo sólida adequada aos mesmos e água *ad libitum* durante todo o experimento. Foram mantidos em gaiolas padronizadas, etiquetadas e identificadas com o número do grupo ao qual pertenciam, data de nascimento, peso, data da cirurgia, data do óbito, nome do pesquisador e orientador. A limpeza das gaiolas foi realizada três vezes por semana, com água corrente, sabão e desinfetante.

### 3.3 MATERIAL EXPERIMENTAL

Parafusos de titânio comercialmente puro (Promm®)<sup>1</sup>, com 1.5mm de diâmetro e 3.5mm de comprimento, foram utilizados neste experimento. O  $\beta$ -trifosfato de cálcio ( $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ ) em grânulos (0.5  $\mu\text{m}$ ) foi produzido e fornecido pelo Labiomat – Laboratório de Biomateriais da Faculdade de Engenharia de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As peças de titânio e o biomaterial foram previamente esterilizados em autoclave a 120° C por 30 minutos (Fig.2 - Anexo).

### 3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais tiveram a ração suspensa por quatro horas antes dos procedimentos cirúrgicos, permanecendo com ingestão de água *ad libitum*. Após a pesagem em balança de precisão, foi feita profilaxia antibiótica com Cefalexina 60 mg /kg, 1 hora antes do procedimento.

---

<sup>1</sup> PROMM® Comércio de Implantes Cirúrgicos, Porto Alegre, RS, Brasil. [www.promm.com.br](http://www.promm.com.br)

Os ratos foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina<sup>2</sup> 50 mg/kg (0,05ml/100g) e Cloridrato de Xilazina<sup>3</sup> 5mg/kg (0,025 ml/100g) via intraperitoneal . Procedeu-se com a tricotomia na região do crânio e antissepsia com Clorexidina 2%. Foi feito um retalho de espessura total utilizando lâmina de bisturi n<sup>o</sup>15, seguido de divulsão e exposição da calota craniana (Fig 3 - Anexo).

Utilizando uma broca esférica carbide (1.5mm) em baixa rotação e sob irrigação de soro fisiológico 0.9%, foram feitas duas cavidades na porção superior da calota, distantes 5mm entre si. Na cavidade esquerda foi colocado  $\beta$ -trifosfato de cálcio ( $\beta$ - TCP), misturado ao sangue presente na cavidade, enquanto a cavidade direita (controle) foi preenchida apenas por coágulo. Na porção mais inferior do crânio, foram confeccionadas mais duas cavidades, distantes 5mm, utilizando broca de perfuração 1.5 (Promm<sup>®</sup>) em baixa rotação. Na cavidade esquerda foi feito o forramento com  $\beta$ - TCP e introduzido um parafuso de titânio comercialmente puro (compatível com a broca de perfuração). Já na cavidade direita, foi introduzido apenas o parafuso de titânio (Fig 4A - Anexo). O retalho foi suturado com fio mononylon 4.0 (Fig 4B - Anexo).

Para recuperação anestésica, os animais foram colocados em posição de decúbito ventral, permanecendo em suas respectivas gaiolas, sob aquecimento e divididos por grupo, de acordo com o período de morte . Foi oferecida ração e água “ad libitum”. Nas primeiras 24hs pós-operatórias, dissolveu-se 125 mg de paracetamol em 200 ml de água oferecida. Os ratos permaneceram nas respectivas gaiolas até o momento da morte. Ficaram sob os cuidados do vivário, sendo acompanhados diariamente.

### 3.5 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DA PEÇA OPERATÓRIA

Após o período de observação pós-operatório previsto para cada grupo, procedeu-se à morte dos animais por meio de inalação de isoflorano.

---

<sup>2</sup> Dopalen<sup>®</sup> VETBRANDS Indústria Brasileira. [www.cevabrazil.com.br/bulas/Bula\\_Dopalen](http://www.cevabrazil.com.br/bulas/Bula_Dopalen)

<sup>3</sup> Anasedan<sup>®</sup> VETBRANDS Indústria Brasileira. [www.cevabrazil.com.br/bulas/Bula\\_Anasedan](http://www.cevabrazil.com.br/bulas/Bula_Anasedan)

Para obtenção da peça operatória, foi feita uma nova incisão na região mais posterior dos tecidos moles da cabeça com lâmina de bisturi nº15 e divulsão com auxílio de uma tesoura de Matzenbaun e pinça Adson Brown. Procedeu-se a remoção da calota craniana através de quatro linhas de osteotomia em torno dos defeitos ósseos, utilizando um disco diamantado em baixa rotação, sob irrigação de soro fisiológico 0.9% (Fig 5A - Anexo). As linhas de osteotomia respeitaram uma distância de 4 a 5mm da área dos defeitos. Removeu-se a calota com auxílio de um descolador de Molt e pinça Adson Brown (Fig. 5B - Anexo).

As peças foram colocadas em recipientes separados, devidamente etiquetados, contendo formol a 10%. Os animais foram descartados em sacos plásticos e enviados para incineração, conforme protocolo do Biotério da Faculdade de Biociências da PUCRS.

### 3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Posteriormente à fixação em formol por um período entre 24 e 72 horas, iniciou-se a confecção das lâminas histológicas, realizada no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da PUCRS. As peças foram descalcificadas em solução de ácido nítrico a 5% (10 ml) durante aproximadamente 72 horas, seguindo-se a sua desidratação, em concentrações sucessivas de álcool (de 80 até 100%).

Após a remoção dos parafusos de titânio, utilizando a chave de parafuso da PROMM<sup>®</sup>, os espécimes foram divididos ao meio, sendo que cada segmento continha dois defeitos: um segmento contendo os defeitos sem parafuso e o outro contendo os defeitos com parafuso (Fig. 6 - Anexo). Realizou-se o processamento histológico de rotina para a confecção das lâminas, sendo estas incluídas em parafina, cortadas em secções de 5 µm de espessura, com micrótomo<sup>4</sup>, à partir do maior diâmetro do defeito, coincidindo o plano de corte longitudinalmente com as cavidades preparadas. Após, foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). A análise histológica foi feita pela mesma examinadora, previamente calibrada

---

<sup>4</sup> Leica Jung RM 2055



por patologista. A cada 20 lâminas observadas, a observação de 10 lâminas era repetida, comparando os dados obtidos nas observações. Para isso, utilizou-se um microscópio óptico<sup>5</sup>.

As imagens histológicas em aumento de 40X foram capturadas, do microscópio pelo computador, utilizando o programa *Image- Pró Plus*<sup>6</sup> (Fig.7 - Anexo). O programa não permite fotografar as imagens do defeito em sua totalidade, por isso estas foram tomadas em dois ou três segmentos e, após, montadas. Foram observados: a) a presença e o volume de tecido conjuntivo frouxo e de tecido ósseo imaturo; b) presença ou ausência de material remanescente ( $\beta$ -TCP) no defeito. Foi realizada uma análise transversal, observacional e descritiva.

---

<sup>5</sup> Modelo Olympus BX 50

<sup>6</sup> Image-Pró Plus ®, versão 6.2, Media Cybernetics, USA.

#### 4 ARTIGO

A ser submetido para publicação no *Journal of Oral Science*.

### **Analysis regarding the repair of bone defects filled with $\beta$ -tricalcium phosphate associated to pure titanium implants.**

Roberta Weirich Mottin, DDS<sup>1</sup>; Juliana Goelzer, DDS<sup>2</sup>; Daniela Nascimento<sup>3</sup> Silva, DDS, MS, PhD; João Batista Burzlaff<sup>4</sup>, DDS, MS, PhD; Claiton Heitz<sup>5</sup>, DDS, MS, PhD.

- 1- Post-Graduate Program in Dentistry, MS Student in Oral Maxillofacial Surgery, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul- PUCRS, Porto Alegre, Brazil.
- 2- Post-Graduate Program in Dentistry, MS Student in Oral Maxillofacial Surgery, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul- PUCRS, Porto Alegre, Brazil.
- 3- Associate Professor in Oral Maxillofacial Surgery, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul- PUCRS, Porto Alegre, Brazil.
- 4- Associate Professor in Oral maxillofacial Surgery, Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS, Porto Alegre, Brazil.
- 5- Chairman Oral Maxillofacial Surgery, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul- PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

**Abstract:**

Concerning the necessity of form and function restoration from bone structures which had been lost through pathologies, traumas or iatrogenicity has been widely studied. The researches have been trying to develop new materials in order to recover or maintain the bone volume as well as quality into regions which have lost their proper anatomic conformations, being biomaterials the most suitable ones as a viable alternative as bone substitutes.  $\beta$ - tricalcium phosphate granule ( $\beta$ -TCP) is an inorganic composite which combines active biodegradability properties with osteoconductivity. The present study aims to develop a histological descriptive analysis on the repair of bone defects filled with  $\beta$ -TCP associated to pure titanium implants into cavities prepared in the calvarium bone of rats. Eighteen male adult rats were randomly selected and divided into three groups of six rats each, according to their period of death: 15, 30 and 60 days. Four bone defects were made into each one of the calvarium bone of the rats and filled with: (a)  $\beta$ -TCP, (b) clot, (c)  $\beta$ -TCP + pure titanium screw and (d) pure titanium screw. The samples were cut and histologically evaluated. The analysis moved through the presence and volume of connective tissue and newly formed bone, as well as the presence or absence of remaining material ( $\beta$ -TCP) into the defect. It was verified an acceleration of the new bone formation process in the presence of  $\beta$ -TCP. The results suggest the biocompatibility and osteoconductivity of the biomaterial, even when associated to pure titanium implants.

Key-words: Biomaterials. Calcium Phosphate. Defects.

## Introduction

The repair of the bone tissues damaged by traumas or pathologies and the reconstruction of the alveolar ridge are fundamentally important for odontology. Although being considered the gold pattern for grafting, the autografts require a donor area and some complications associated to it have been reported <sup>1,2</sup>.

The defects filling is facilitated by the osteoconduction which is characterized as production of a new bone through proliferation and migration of osteocompetent cells along the conductor. The Calcium Phosphate ceramics band the properties of osteoconduction, biocompatibility, bioactivity, in addition to its manipulation facilities during the surgical procedure. Nevertheless, they have low levels of resistance to the impact and the tensile force<sup>3,4</sup>.

By definition, only the bioactive materials establish chemical bonds with the bone.  $\beta$ -TCP granule is an inorganic compost that presents significant osteogenic activity in the presence of mature cells <sup>5</sup>.

The titanium is known as a biocompatible material and it is successfully used in odontology and orthopedics. Nonetheless, the bone conduction around the titanium is inferior to the one which occurs around the bioactive ceramics such as calcium phosphate <sup>6</sup>. The use of biomaterials, as the  $\beta$ -TCP, associated to commercially pure titanium implants, aims to adapt the mechanical properties of metals to the bone healing properties of biomaterials.

In the present study we performed a histological descriptive analysis of the bone repair in defects filled with  $\beta$ -Tricalcium Phosphate, associated to pure titanium implants, regarding the osteoconductive properties of the  $\beta$ -TCP and verifying if those properties are maintained when the biomaterial is associated to the titanium.

## Materials and Methods

This study was developed according to the Ethical Principles of Experiments on Animals. A total of 18 male adult rats, from the *Rattus Norvegicus* species, lineage *Wistar*, with the average weight from 280 to 320g, were used in this experiment. The animals were randomly divided into three groups of six rats each, according to the period of death (15, 30 and 60 days). Four defects were made in the calvarium bone of the animals, each one of the defects representing a group: A)  $\beta$ - TCP group; B) Clot group (control ); C)  $\beta$ - TCP + screw group; D) Screw group.

General anesthesia was induced by intraperitoneal injection of veterinary ketamine cloridrate (Dopalen<sup>®</sup>) 50 mg/kg (0,05ml/100g) and xilazine cloridrate (Anasedan<sup>®</sup>) 5mg/kg (0,025 ml/100g). After the vertex cranium had been shaved and disinfected, a full-thickness flap was raised to expose the cranium bone. Using a spherical carbide drill (1.5mm) in low rotation, under irrigation of saline solution 0.9%, two cavities were prepared in the superior portion of the parietal bone, with a 5 mm distance between them. Granular  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ - TCP) was placed in the left cavity and mixed to the present blood, whereas the right cavity (control) was filled only by the clot. Two more cavities were prepared in the most inferior portion of the parietal bone, with a 5 mm distance between them, through a perforation drill of 1.5 (Promm<sup>®</sup>, Porto Alegre, RS, Brazil) in low rotation. It was made a liner with  $\beta$ - TCP in the left cavity and a commercially pure titanium screw, compatible with the perforation drill, was introduced. Finally, only a titanium screw was placed in the right cavity. The flap was sutured with a 4.0 mononylon wire.

After the previewed healing period of 15, 30 and 60 days, the animals death proceeded by isoflurane inhalation. The soft tissue of the experimental area was removed and biopsy specimens of the parietal bone, comprising the four bone defects, were taken in bloc and fixed in 10% formalin.

The pieces were decalcified, dehydrated and the titanium screws removed. A total of 4 sections/ specimen were prepared. The first section was longitudinally cut from the center of the defect, grounded to a thickness of 5 $\mu$ m, so that each one of the segments contained two defects (with or without screw). Histological descriptive analysis regarding the bone healing of defects was performed through the following parameters: 1) the presence and volume of connective tissue and newly formed bone; 2) the presence and the absence of remaining biomaterial ( $\beta$ -TCP) into the defect.

## Results

### Histological Analysis

#### Clot group:

15 days: Connective tissue, closely filling the entire defect, and a small quantity of newly formed bone on the surface of the host bone was observed (Figure 1).

30 days: Gradual replacement of connective tissue by the newly formed bone was verified. The osteogenesis area was increased compared with 15 days (Figure 2).

60 days: Newly formed bone progressed towards the center of the defect. The thickness of the newly formed bone was increased, compared with 30 days (Figure 3).

#### $\beta$ -TCP Group:

15 days: Presence of remaining biomaterial surrounded by the connective tissue was observed, as well as intense osteoblastic activity on the defect ridges with centripetal immature bone formation (Figure 4).

30 days: Remaining biomaterial was surrounded by newly formed bone. The thickness of the immature bone along the defect ridges was increased compared with 15 days (Figure 5).

60 days: Important centripetal progression of the newly formed bone was verified, besides intense osteoblastic activity in the defect central area, with the remaining material surrounded by newly formed bone, which closely fills the entire extension of the defect (Figure 6).

#### Titanium Screw Group

15 days: Connective tissue around the cavity previously occupied by the titanium screw was observed (Figure 7).

30 days: Area corresponding to the screw flange in the left extremity, with lines of new bone formation in centripetal direction. The thickness of the connective tissue was decreased, compared with 15 days (Figure 8).

60 days: Immature bone formation was located in both defect extremities. Foreign body was present integrated to the bone tissue (Figure 9).

#### Titanium Screw + $\beta$ -TCP Group

15 days: Area of newly formed bone in both defect extremities in contiguity to the remaining material (Figure 10).

30 days: Newly formed bone growth towards to the defect center (Figure 11).

60 days: Important osteoblastic activity associated with newly formed bone. The width of the cavity, previously occupied by the titanium screw, was decreased (Figure 12).

## Discussion

Bone graft materials are categorized into four groups: autografts, allografts, xenografts, and alloplasts<sup>7,8</sup>, having their use justified by the feature of serving as scaffolds for bone regeneration. The disadvantages or limitations of the autografts, like the necessity of a donor site, justify the search for alternative materials, and the alloplasts or synthetic grafts, as the calcium phosphate ceramics, have been presented as a viable possibility.

In the present study, it was observed that, at 15 days, the connective tissue involved the remaining  $\beta$ -TCP particles. This connective tissue was gradually substituted by immature bone. At this time, newly formed bone was observed continued to the host bone surface, which became more pronounced at 30 days. Nevertheless, at 60 days, an invasion of the newly formed bone towards the center of the defect was seen, both in  $\beta$ -TCP group and  $\beta$ -TCP + titanium screw group. Those observations suggest the biocompatibility and osteoconductivity of the biomaterial, ratifying the findings of Yamada et al.<sup>1</sup> and Merten et al.<sup>9</sup>

Grandi<sup>10</sup> evaluated two types of bioceramic –  $\alpha$  tricalcium phosphate ( $\alpha$ -TCP) and  $\beta$  tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) – in bone defects prepared in the calvarium bone of rats. It was observed that there was a permanence of  $\beta$ -TCP granules for a longer period of time in the cavity, which provided the volume maintenance of the material, filling the defect. The authors understood that both bone substitutes have the necessary characteristics for clinic use. The present study verified the maintenance of  $\beta$ -TCP at 60 days, promoting bone regeneration, centripetally oriented. It was chosen the calcium phosphate in the beta phase, since that is considered the most stable phase of the material<sup>1,10,11</sup>.

Yuan et al.<sup>10</sup> performed a study in dogs to evaluate the bone induction by the Calcium Phosphate ceramics. After 2.5 years of follow-up, it was observed that the newly formed bone, confined inside the pores of the implants, remained stable. The results suggest not only the efficacy and safety of the osteoinductive calcium phosphate biomaterials for clinical use, but also the possibility for further optimizing and improving osteoinductive calcium phosphate biomaterials.

The bioinert nature of titanium and its alloys must be modified towards bioconductivity if a strong interface bonding between implant and host bone is desired<sup>12</sup>. Because they are bioinert, the bone integration of such implants does not occur in ideal conditions<sup>13</sup>. The present study observed an association of the titanium mechanical

properties to the bone healing characteristics of  $\beta$ -TCP, which allowed a fast bone formation around the implant.

It was verified that the newly bone formation was increased in the experimental groups when compared to the control group. This agrees with Shiratori et al. <sup>5</sup>, who performed a study in femurs of rats in order to evaluate the bone formation in defects filled with  $\beta$ -TCP, through a histomorphometric analysis and evaluation of the related mRNA bone protein expression. It was observed that the quantity of newly formed bone in all the defect extension was significantly increased in the group in which  $\beta$ -TCP had been engrafted than in the control group (in which the bone defects were not filled with  $\beta$ -TCP). According to the authors, the results showed that the  $\beta$ -TCP is an appropriate material for the osteoconduction, providing bone formation.

Nakadate et al. <sup>14</sup> evaluated the characteristics of the newly formed bone around dental implants, concomitantly inserted with tricalcium phosphate grafts. The osteogenesis was examined in two clinical relevant sites: the surface of the biomaterial and the interface between the biomaterial and the implant. It was observed reactive osteoclasts invading the area with biomaterial and, shortly after, osteoblasts setting bone matrix into the region that was reabsorbed. By electronic microscopy, it was noted direct contact between the bone tissue and the implant surface. The results of our study suggest that there was direct contact between  $\beta$ -TCP and the titanium surface, providing a faster bone formation in the areas where the biomaterial was used.

The data originated from this work indicates that  $\beta$ -TCP can be useful in non-critical bone defects, promoting a fast replacement by newly formed bone, preventing soft tissue growth in the defect and maintaining the osteoconduction properties even when associated to commercially pure titanium.

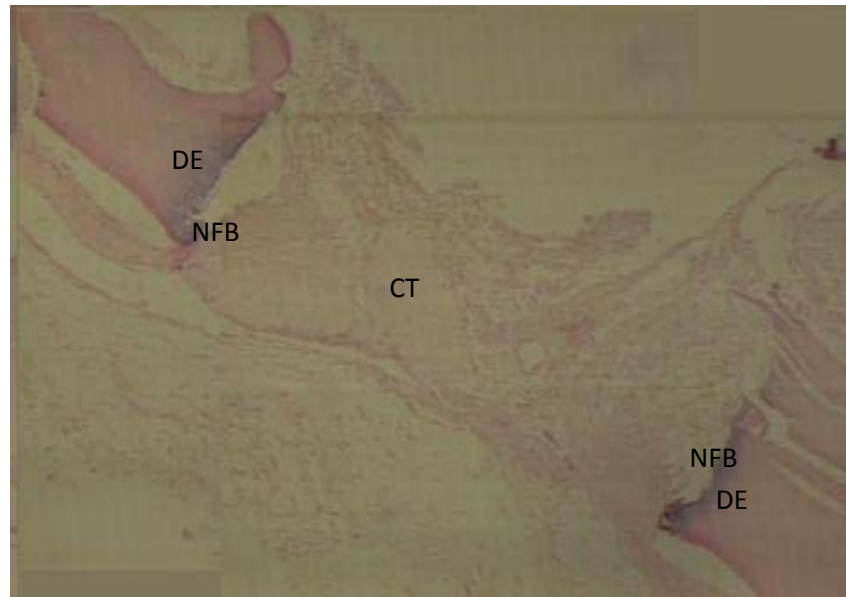


## References

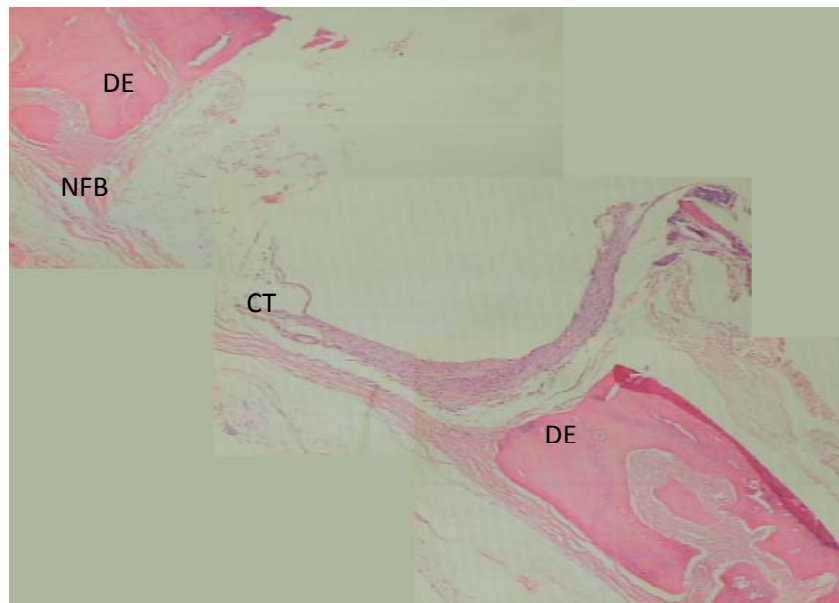
- 1-Yamada M, Shiota M, Yamashita Y, Kasugai S. Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of  $\alpha$ - and  $\beta$ - tricalcium phosphate in block grafts. *Journal of Biomedical Materials Research* 2006; Part B: 139-148.
- 2-Jensen, S.S. et al. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and  $\beta$ - tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Impl Res* 2006; 17:237-243.
- 3-Marx, RE, Stevens MR. Reconstruction of avulsive maxillofacial injuries. In: Fonseca RJ, Walker, RV, Betts NJ, Barber HD. *Oral and Maxillofacial Trauma*, 2 ed. Philadelphia: W.B Saunders Company, 1997. v.2, cap 35, p.1101-1203.
- 4-Schenk RK. Regeneração óssea: bases biológicas. In: BUSER D, Dahlin C, Schenk RK. *Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia*, Chicago: Quintessence books, 1996. cap.3, p.49-100.
- 5-Shiratori K, Matsuzaka K, Koike Y, Murakami S, Shimono M, Takashi I. Bone formation in  $\beta$  - tricalcium phosphate-filled bone defects of the rat femur: Morphometric analysis and expression of bone related protein m RNA. *Biomedical Research* 2005; 26(2):51-9.
- 6-Hanawa, T. et al. Early bone formation around calcium-ion-implanted titanium inserted into rat tibia. *J Biomed Mater Res* 1997; 36:131-136.
- 7-Spiekermann H. *Implantology: color atlas of dental medicine*. New York: Georg Thieme Verlag 1995.
- 8-Misch CE. *Implantes Dentários Contemporâneos*. 2. ed. São Paulo: Santos 2000. Cap 29. p. 451-467.
- 9-Merten, HA, Wiltfang J, Grohmann U, Hoenig JF. Intraindividual comparative animal study of  $\beta$  and  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate degradation in conjunction with simultaneous insertion of dental implants. *The J Craniofac Surg* 2001; 12(1): 59-68.
- 10-Grandi G. Análise histomorfométrica comparativa entre  $\alpha$ - TCP e  $\beta$ -TCP / HA no reparo ósseo de calotas cranianas de ratos. *Dissertação de Mestrado*. Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio grande do Sul, 2007.
- 11-Yuan, H. et al. Material-dependent bone induction by calcium phosphate ceramics: a 2.5 year study in dog. *Biomaterials* 2001; 22: 2617-2623.
- 12-Wei, D, Zhou Y, Jia D, Wang Y. Structure of calcium titanate/titania bioceramic composite coatings on titanium alloy and apatite deposition on their surfaces in a simulated body fluid. *Surface e Coatings Technology* 2007;201:8715-8722.

13-Li, Y. et al. Biological performance in goats of a porous titanium alloy- biphasic calcium phosphate composite. *Biomaterials* 2007; 28: 4209-4218.

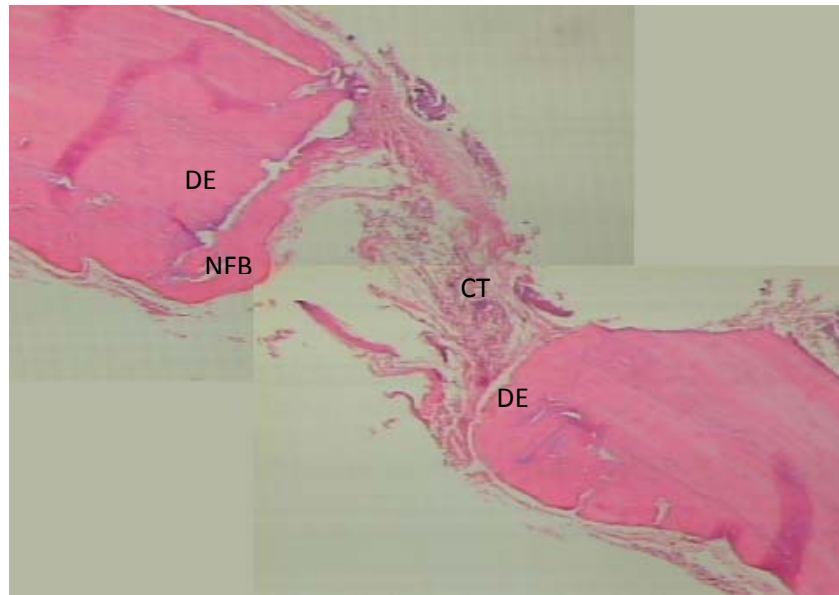
14-Nakadate et al. Histological evaluation on bone regeneration of dental implant placement sites grafted with a self-setting alpha-tricalcium phosphate cement. *Microsc Res Tech.* 2006; 17.



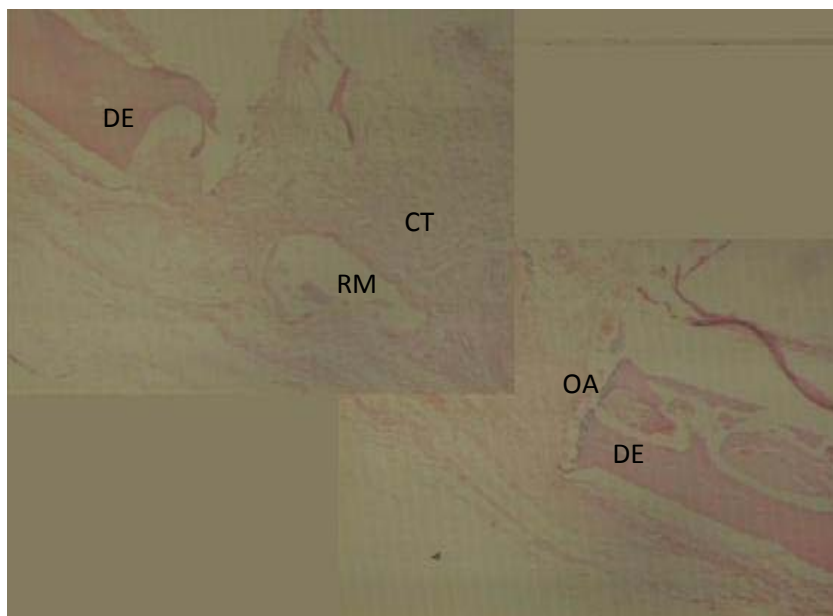
**Figure 1** - Histological observation of the Clot group (control), 15 days: DE – defect edge. CT – connective tissue. NFB – newly formed bone. Histological cuts stained with HE, observed by a microscope (magnification x 40).



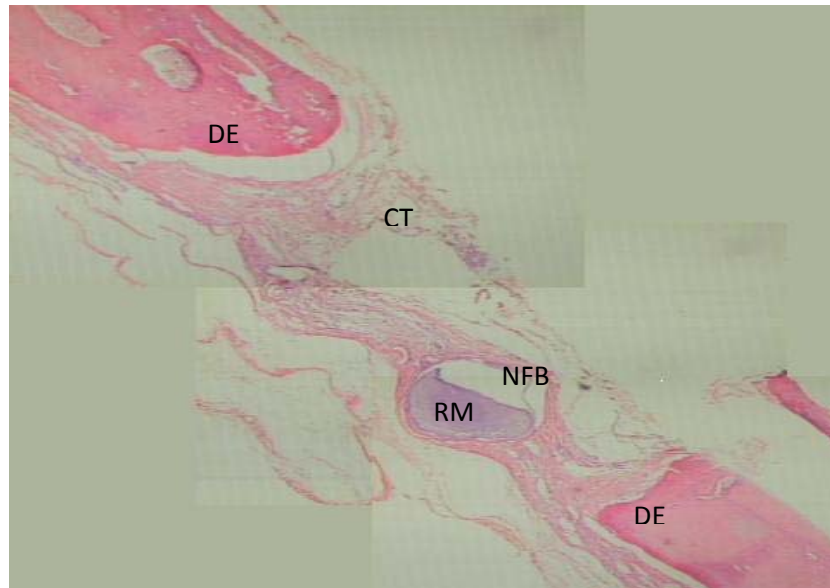
**Figure 2** - Clot group (control), 30 days: DE – defect edge; CT – connective tissue. NFB – newly formed bone. Histological cuts stained with HE, observed by a microscope (magnification x 40).



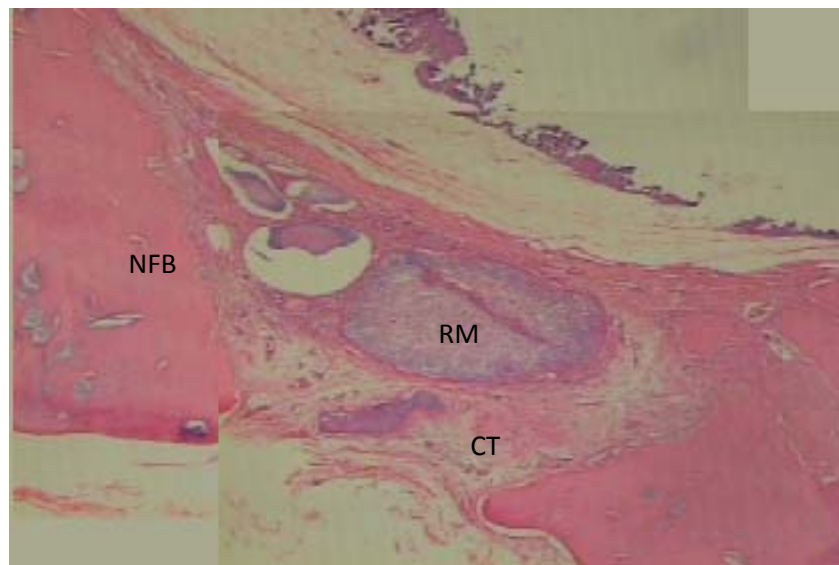
**Figure 3** - Clot group (control), 60 days: DE – defect edge; CT – connective tissue. NFB - newly formed bone. Histological cuts stained with HE, observed by a microscope (magnification x 40).



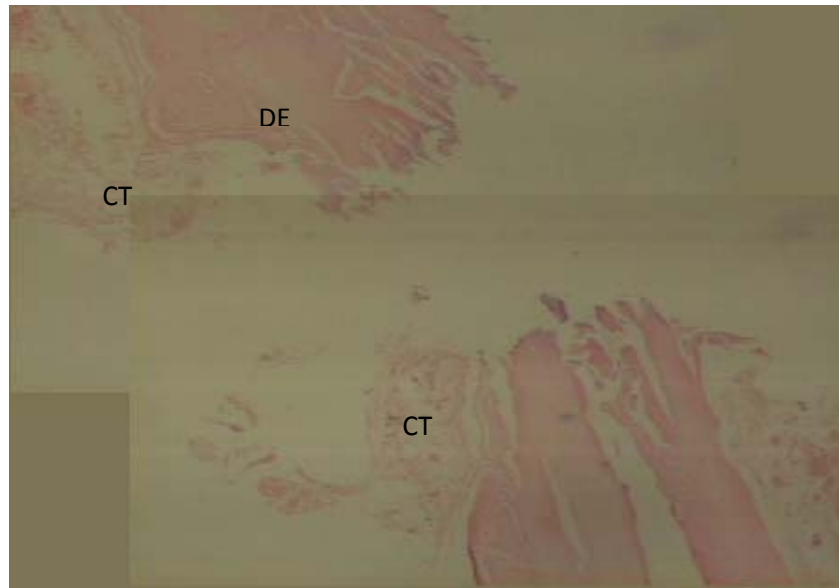
**Figure 4** -  $\beta$ -TCP group, 15 days: DE – defect edge; CT – connective tissue; RM – remaining material. OA - osteoblastic activity. Histological cuts stained with HE, observed by a microscope (magnification x 40).



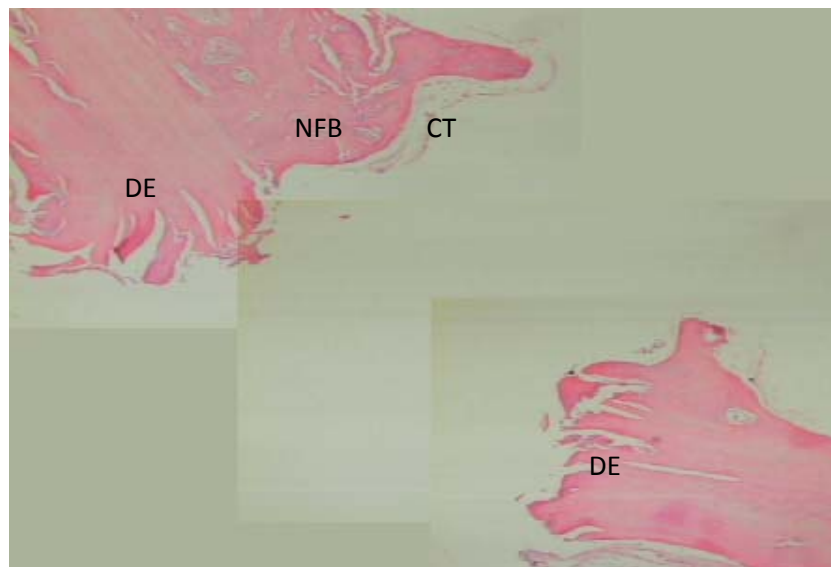
**Figure 5** -  $\beta$ -TCP group, 30 days: DE – defect edge; CT – connective tissue RM – Remaining Material. NFB - newly formed bone. Histological cuts stained with HE, observed by a microscope (magnification x 40).



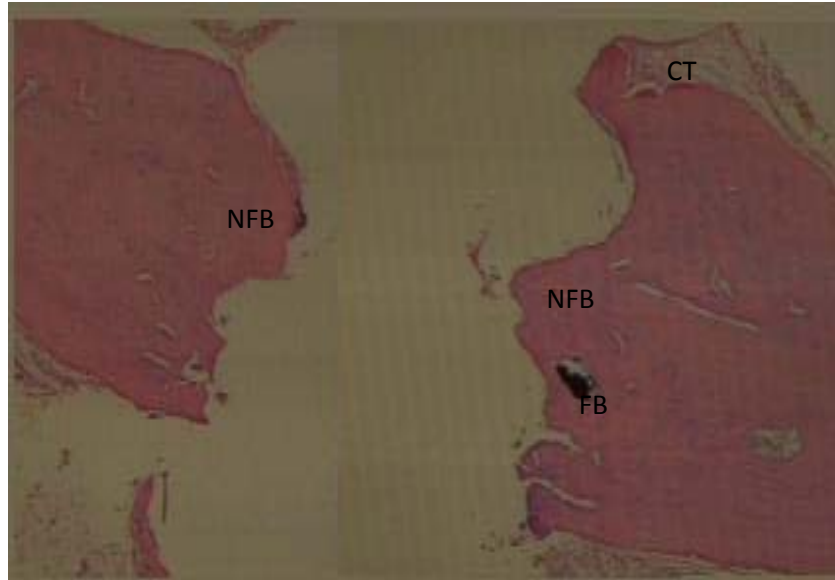
**Figure 6** -  $\beta$ -TCP group, 60 days. CT – connective tissue. RM – remaining material. NFB - newly formed bone. Histological cuts stained with HE, observed by a microscope (magnification x 40).



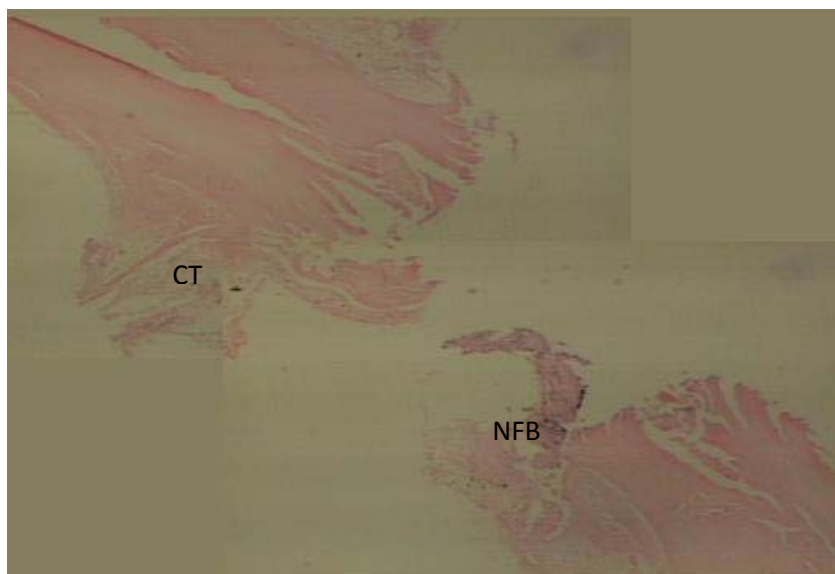
**Figure 7** - Screw group (control), 15 days. DE – defect edge. CT – connective tissue; Histological cuts stained with HE, observed by a microscope (magnification x 40).



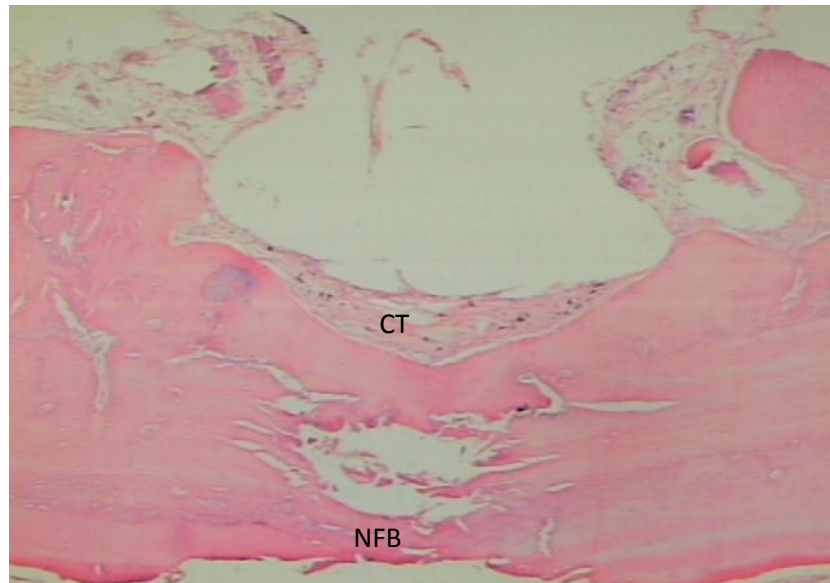
**Figure 8** - Screw group (control), 30 days. DE – defect edge; CT – connective tissue. NFB – newly formed bone. Histological cuts stained with HE, observed by a microscope (magnification x 40).



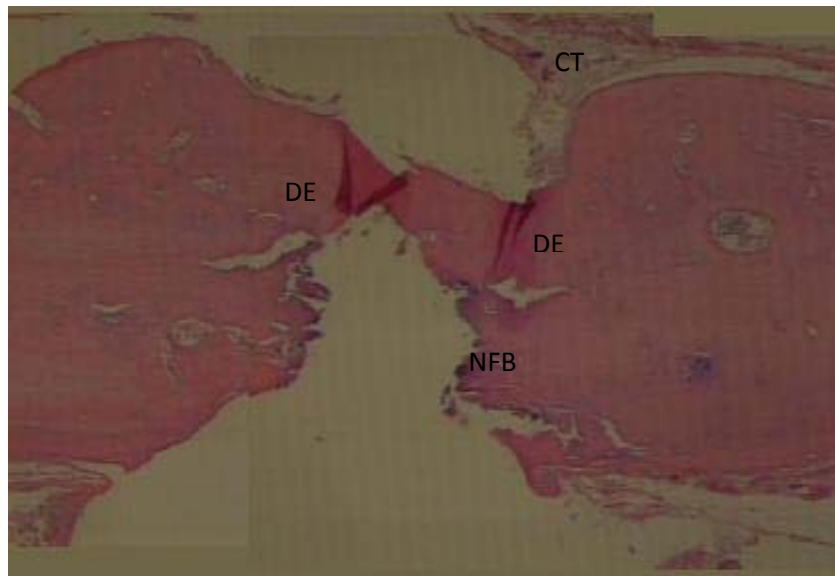
**Figure 9** - Screw group (control), 60 days. CT – connective tissue. NFB - newly formed bone. FB – foreign body. Histological cuts stained with HE, observed by a microscope (magnification x 40).



**Figure 10** -  $\beta$ -TCP + Screw group, 15 days. CT – connective tissue. NFB - newly formed bone. Histological cuts stained with HE, observed by a microscope (magnification x 40).



**Figure 11** -  $\beta$ -TCP + Screw group, 30 days. CT – connective tissue. NFB - newly formed bone. Histological cuts stained with HE, observed by a microscope (magnification x 40).



**Figure 12** -  $\beta$ -TCP + Screw group, 60 days. DE – defect edge. CT – connective tissue. NFB - newly formed bone. Histological cuts stained with HE, observed by a microscope (magnification x 40).



## 5 DISCUSSÃO GERAL

Os avanços tecnológicos experimentados pela ciência em seus diversos campos, incluindo a área de biomateriais, objetivam o bem-estar do homem. Na odontologia, a restauração funcional e estética do sistema estomatognático é uma das metas a ser alcançada cada vez com mais conforto e segurança. Os metais, como o titânio e suas ligas, e as cerâmicas de fosfato de cálcio oferecem perspectivas de sucesso imediato e em longo prazo para implantodontia, sendo de fundamental importância a continuação e diversificação das pesquisas.

As observações deste estudo sugerem as propriedades de biocompatibilidade e osteocondutibilidade do  $\beta$ -TCP, ratificando os achados de trabalhos anteriores (Shiratoriet al., 2005; Grandi, 2007; Yuan et al., 2007; Li et al., 2007). Houve uma aceleração do processo de neoformação óssea, quando utilizado o  $\beta$ -TCP. Tais propriedades se mantiveram na presença do titânio puro, indicando que a associação do biomaterial ao titânio possui aplicação clínica em defeitos ósseos não - críticos.

A associação das cerâmicas de fosfato de cálcio ao titânio comercialmente puro, em defeitos ósseos críticos é uma perspectiva para novos estudos que comprovem sua eficácia e estabilidade em longo prazo.

## 6 REFERÊNCIAS

CARVALHO, H.F.; BUZATO, C.B.C. **Células**: uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Manole, 2005.

COOK, S.D.; RUEGER, D.C. Osteogenic protein-1: biology and applications. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, 324: 29-38, 1996.

DRIESSENS F.C. et al. Osteotransductive Bone Cements. **Proc. Inst. Mech. Eng.**, 212(6): 427-35, 1998.

GRANDI, G. **Análise histomorfométrica comparative entre  $\alpha$ -TCP e  $\beta$ -TCP/HA no reparo ósseo de calotas cranianas de ratos**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

HANAWA, T. et al. Early bone formation around calcium-ion-implanted titanium inserted into rat tibia. **J. Biomed. Mater Res.** 36:131-136, 1997.

ISAAC, J. et al. B-TCP Microporosity decreases the viability and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A.**, n386-393, 2007.

JENSEN, S.S. et al. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and  $\beta$ - tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. **Clin. Oral Impl. Res.**, 17:237-243, 2006.

KEATING, J.F.; MCQUEEN, M.M. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. **J. Bone Jt. Surg. Br.**, 83:3-8, 2001.

LE GEROS, R.Z.; LE GEROS, J.P. Calcium phosphate biomaterials in medical application. **Bioceramics**, 9:7-10, 1996.

Li, Y. et al. Biological performance in goats of a porous titanium alloy- biphasic calcium phosphate composite. **Biomaterials**, 28: 4209-421, 2007.

Marx, R.E, Stevens MR. Reconstruction of avulsive maxillofacial injuries. In: Fonseca RJ, Walker, RV, Betts NJ, Barber HD. Oral and Maxillofacial Trauma, 2 ed. Philadelphia: W.B Saunders Company, 2 (35): 1101-1203, 1997.

MERTEN, H.A. et al. Intraindividual comparative animal study of  $\beta$  and  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate degradation in conjunction with simultaneous insertion of dental implants. **The J. Craniofac Surg.**, 12(1): 59-68, 2001.

NG, A.M.H. et al. Differential osteogenic activity of osteoprogenitor cells on HA and TCP/HA scaffold of tissue engineered bone. **J. of Biomedical Materials Research; Part A**: 301-312, 2006.

SANTOS, L.A. **Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado por Fibras para Uso na Área Médico-Odontológica**. 2002, Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SCHENK, R.K. Regeneração óssea: bases biológicas. In: BUSER D, Dahlin C, Schenk RK. **Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia**, Chicago: Quintessence books, 1996, p.49-100.

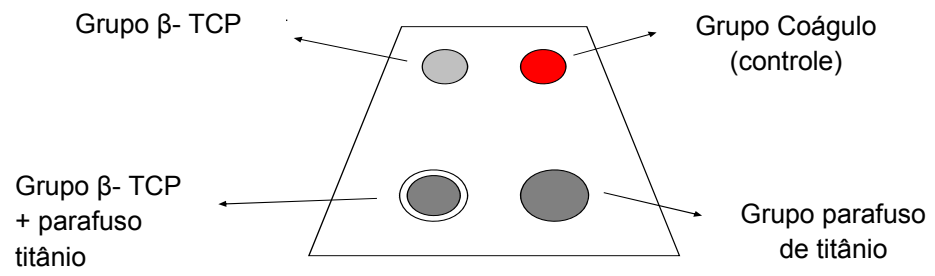
SHIRATORI et al., Bone formation in  $\beta$  - tricalcium phosphate-filled bone defects of the rat femur: Morphometric analysis and expression of bone related protein m RNA. **Biomedical Research**. 26(2):51-9, 2005.

VEECK, E.B.; PURICELLI, E.; LOPES DE SOUZA, M.A. Análise do comportamento do osso e medula hemopoiética em relação a implantes de titânio e hidroxiapatita: Estudo experimental em fêmur de rato. **Revista Odonto Ciência**, 19: 235-291, 1995.

YAMADA, M. et al. Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of  $\alpha$ - and  $\beta$ - tricalcium phosphate in block grafts. **Journal of Biomedical Materials Research, Part B**: 139-148, 2006.

YUAN, H. et al. Material-dependent bone induction by calcium phosphate ceramics: a 2.5 year study in dog. **Biomaterials**, 22: 2617-2623, 2001

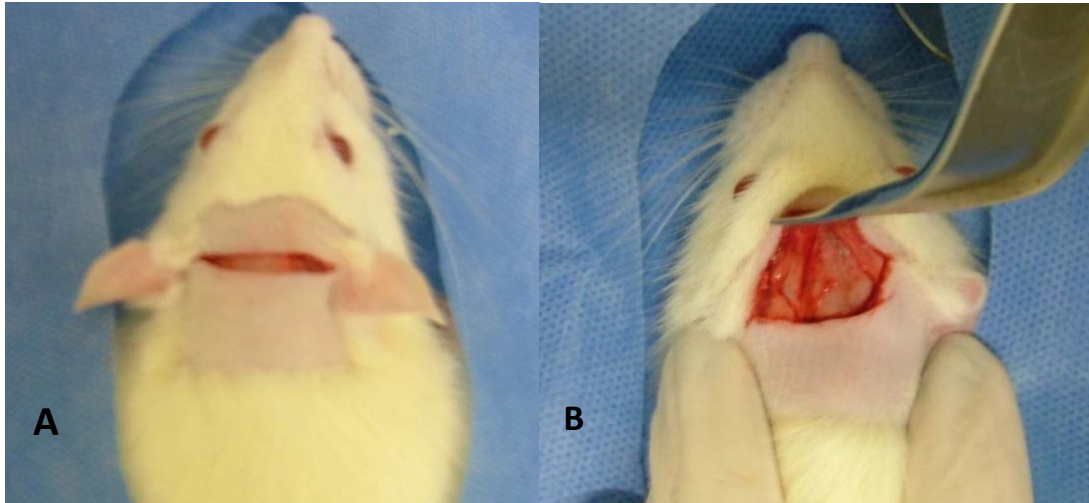
## **ANEXOS**



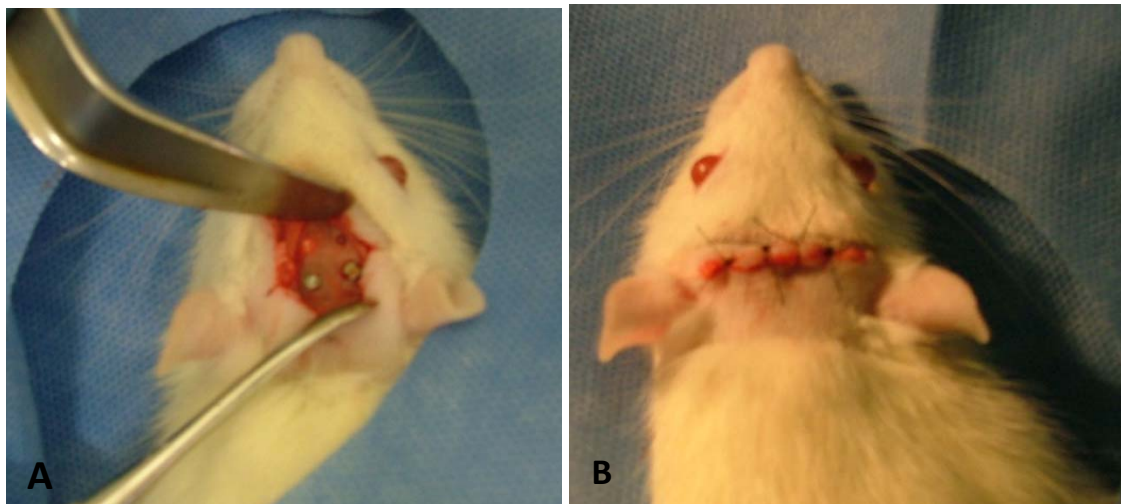
**Figura 1** - Representação esquemática da calota do rato. Defeitos ósseos confeccionados nos ossos parietais.



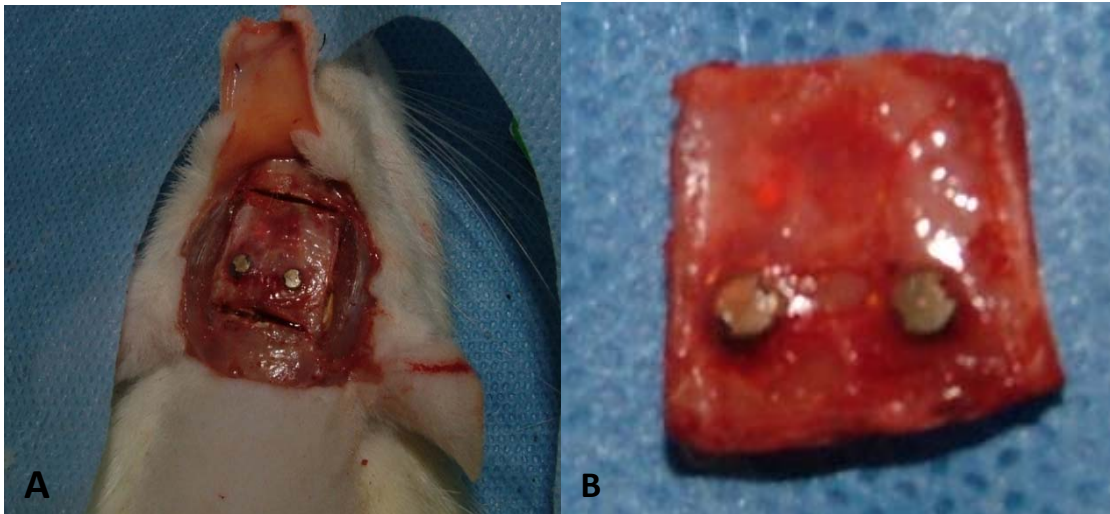
**Figura 2** -  $\beta$ - TCP em grânulos, fornecido pelo Labiomat.



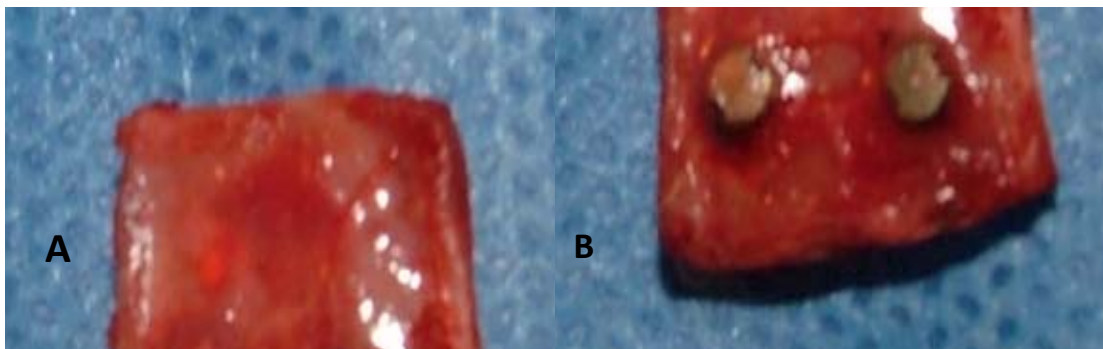
**Figura 3** A) Incisão dermo-periosteal . B) Descolamento do retalho e exposição da calota craniana.



**Figura 4** A) Confeção dos defeitos e inserção do B-TCP nos dois defeitos à esquerda da sutura mediana. Inserção de parafusos de titânio nas duas cavidades inferiores. B) Sutura a pontos isolados.



**Figura 5 A)** Osteotomia em torno dos defeitos ósseos. **B)** Espécime contendo os quatro defeitos ( 30 dias de pós-operatório).



**Figura 6 A)** Segmento da calota contendo os defeitos sem parafuso. **B)** Segmento da calota contendo os defeitos com parafuso.

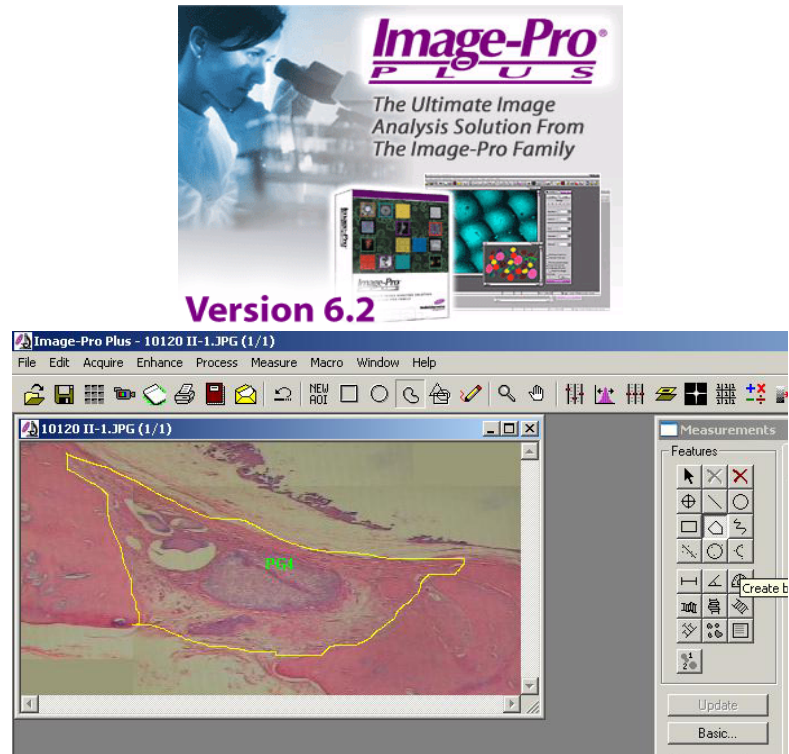


Figura 7 - Programa Image- Pró Plus versão 6.2.