



Gizelli de Souza Dall'Agnol

**Avaliação imunoistoquímica do reparo ósseo em defeitos ósseos tratados com biomateriais xenógenos: estudo comparativo *in vivo*.**

CURITIBA  
2021

Gizelli de Souza Dall'Agnol

Avaliação imunoistoquímica do reparo ósseo em defeitos ósseos tratados com biomateriais xenógenos: estudo comparativo *in vivo*.

Dissertação apresentada a Faculdade ILAPEO como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Odontologia com área de concentração em Implantodontia

Orientador: Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

CURITIBA  
2021

Gizelli de Souza Dall'Agnol

Avaliação imunoistoquímica do reparo ósseo em defeitos ósseos tratados com biomateriais xenógenos: estudo comparativo *in vivo*.

Presidente da Banca Orientador: Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). Tatiana Deliberador  
Prof. Dr. Wilson Roberto Poi

Aprovada em: 05/11/2021

## **Dedicatória**

Hoje não tenho dúvidas de que a vida é guiada por uma força muito maior que aquelas que eu posso mensurar, e esta força me impulsiona para caminhos que, mesmo difíceis e inimagináveis, levam-me às melhores e maiores realizações. Assim, a vida me trouxe o mais fantástico presente que eu poderia receber...maior e mais valioso do que eu poderia desejar, minha filha.

A criança mais amável, pura e com a alma mais elevada dentre todas que já conheci. Filha do meu coração, da minha alma, dos meus sonhos, escolhida por Deus, dedico este trabalho a você.

Espero que possa se orgulhar de sua mãe.

Eu te amo.

## **Agradecimentos**

Agradeço ao meu esposo, Giuliano, aos meus pais Dirce e Roberto, à minha irmã Roberta, meus grandes amores, que não mediram esforços para que eu tivesse todo o apoio necessário durante esta jornada.

Agradeço ao meu Orientador exemplar, Professor Valdir, que não somente me conduziu na área do conhecimento, desde longa data, mas que também me mostrou como deve ser um grande ser humano.

Agradeço ao Prof. Edilson Ervolino, UNESP - FOA, pela execução da análise de imonoistoquímica e obtenção dos resultados.

Agradeço ainda à equipe da Biblioteca da Faculdade ILAPEO, em especial à bibliotecária Andrea, por sua dedicação, seu grande apoio e parceria.

Acima de tudo, agradeço a Deus por Sua companhia constante e pela bênção de conviver com as pessoas acima mencionadas.

## Sumário

1. Artigo científico 1 .....	7
2. Artigo científico 2.....	30

## 1. Artigo científico 1

Artigo de acordo com as normas da Faculdade ILAPEO, para futura publicação no periódico  
**JOURNAL OF CRANIO-MAXILLOFACIAL SURGERY**

### **Avaliação imunoistoquímica do reparo ósseo em defeitos ósseos tratados com biomateriais xenógenos: estudo comparativo *in vivo*.**

Gizelli de Souza Dall'Agnol<sup>1</sup>  
Valdir Gouveia Garcia<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de Implantodontia, da Faculdade Ilapeo.

<sup>2</sup> Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de Implantodontia, da Faculdade Ilapeo.

#### **RESUMO**

O restabelecimento morfológico e funcional de defeitos ósseos representa um desafio clínico que requer maiores evidências científicas para uma adequada seleção do substituto ósseo pelo profissional. O objetivo do presente estudo foi realizar avaliação imunoistoquímica comparativa de dois substitutos ósseos xenógenos em defeitos ósseos de tamanho crítico ( $\varnothing = 5$  mm) criados em calota craniana de ratos. Trinta animais foram randomizados em 3 grupos que receberam um dos seguintes tratamentos: Grupo C (n=10) denominado de Controle, os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo; Grupo Bio-Oss<sup>®</sup> (n=10), os defeitos foram preenchidos com osso medular bovino (Bio-Oss<sup>®</sup>), Grupo Bonefill (n=10), os defeitos foram preenchidos com osso cortical bovino (Bonefill). Todos os defeitos foram protegidos com uma membrana de cortical óssea bovina, antes do fechamento da ferida cirúrgica. Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados após 30 e 45 dias de pós-operatório e os espécimes, submetidos a processamento laboratorial para avaliação imunoistoquímica. Foi utilizado imunomarcador ósseo para BMP2/4, Osteocalcina (OCN) e Fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP). Os resultados revelaram que os espécimes do grupo Bio-Oss<sup>®</sup> demonstraram maior atividade da BMP2/4 e OCN, revelando a formação de tecido ósseo mais maduro, em ambos os períodos. Os resultados permitiram concluir que ambos os biomateriais se mostraram biocompatíveis; que não houve diferenças estatísticas significantes em comparação ao grupo controle; porém entre os biomateriais avaliados, o Bio-Oss<sup>®</sup> mostrou, em ambos os períodos de avaliação, tendência a promover melhor reparo ósseo quando comparado com o Bonefill, com maior evidência aos 45 dias.

**Palavras-chave:** Defeito ósseo; Enxerto ósseo; Regeneração óssea; Modelo animal.

#### **ABSTRACT**

The morphological and functional restoration of bone defects represents a clinical challenge that requires more scientific evidence for an adequate selection of the bone substitute by the professional. The aim of the present study was to perform a comparative immunohistochemical evaluation of two xenogenous bone substitutes in critical size bone defects ( $\varnothing = 5$  mm) created in the rat skullcap. Thirty animals were

randomized into 3 groups that received one of the following treatments: Group C (n=10) called Control, the defects were filled with blood clot; Bio-Oss® Group (n=10), defects were filled with bovine medullary bone (Bio-Oss®), Bonefill Group (n=10), defects were filled with bovine cortical bone (Bonefill). All defects were protected with a bovine cortical bone membrane prior to surgical wound closure. Five animals from each group were euthanized 30 and 45 days after surgery and the specimens were submitted to laboratory processing for immunohistochemical evaluation. Bone immunomarker for BMP2/4, Osteocalcin (OCN) and resistant tartrate acid phosphatase (TRAP) was used. The results revealed that the specimens of the Bio-Oss® group showed greater activity of BMP2/4 and OCN, revealing the formation of more mature bone tissue, in both periods. The results allowed us to conclude that both biomaterials proved to be biocompatible; that there were no statistically significant differences compared to the control group; however, among the evaluated biomaterials, Bio-Oss® showed, in both evaluation periods, tendency to promote better bone repair when compared to Bonefill, with greater evidence at 45 days.

**Keywords:** Bone defect; Bone graft; Bone regeneration; Animal model.

## INTRODUÇÃO

A presença de defeitos ósseos extensos onde a possibilidade de regeneração óssea espontânea mostra-se limitada continua sendo um grande desafio a ser vencido, tanto na área médica quanto odontológica. Na maioria dos casos há a necessidade de recorrer ao uso de um substituto ósseo capaz de restabelecê-lo morfofuncionalmente.

Está claro na literatura que o tecido ósseo obtido do próprio paciente (enxerto autógeno) considerado como o material de escolha, o "padrão ouro". Porém há situações em que seu uso encontra-se limitado, como diante da necessidade de um grande volume de tecido ósseo ou quando há áreas doadoras insuficientes para sua obtenção. Destaca-se que neste tipo de procedimento haverá a necessidade de realização de duas áreas cirúrgicas, algumas vezes em ambiente hospitalar, com riscos cirúrgicos de hemorragias e infecções. Como alternativa, o uso de tecido ósseo da mesma espécie, obtidos de bancos de ossos (enxertos alógenos) tem sido proposto, porém o seu uso é pouco aceito e também questionado pelos pacientes por razões diversas como a transmissibilidade de doenças (Betz, 2002; Graham et al. 2010).

Nos últimos anos têm crescido significativamente as pesquisas que empregaram substitutos ósseos originados de outras espécies (enxertos xenógenos). Entre suas características destaca-se a de não promover nenhuma resposta imune, apresentar propriedades osteocondutoras e similaridade com o tecido humano, porém, face à diversidade de metodologia



para sua obtenção, estão sujeitos a sofrerem interferência em sua integração no processo de remodelação do tecido ósseo normal (Takami et al. 2009, Tovar et al. 2014, Wang et al. 2017). Sem dúvida, representam uma opção válida para a solução de diferentes condições, como na preservação das paredes e altura óssea em feridas de alvéolos dentais, na recomposição de defeitos ósseos periodontais e peri-implantares e em procedimento de levantamento de seio maxilar (Juodzbaly e Wang, 2007, Ferreira et al. 2009, Mardas et al. 2010, Araújo et al., 2010, Sbordone et al. 2016, Maiorana et al. 2017, Stacchi et al. 2017).

Diferentes tipos de tecido ósseo xenógeno têm sido relatados na literatura. Diferem-se quanto ao processamento para a sua obtenção, espécie do animal e local de obtenção. Objetivando a remoção do conteúdo orgânico e celular, seu processamento poderá ocorrer, por exemplo, por extração química (Bracey et al. 2018), baixa temperatura (<1500°C) ou temperaturas elevadas (> 1500°C), obtendo cristais de hidroxiapatita longos (Gao et al. 2006). Diferentes biomateriais xenógenos tem sido disponibilizados para uso, destacando-se entre estes o osso cortical seco congelado, hidroxiapatita óssea bovina, matriz óssea bovina desmineralizada (Mahyudin et al. 2017).

A maioria dos estudos têm empregado enxerto xenógeno de origem bovina, porém recentemente tem sido apresentada uma nova opção, o tecido ósseo de porco (Salamanca et al. 2015, Bracey et al. 2018, Bracey et al. 2019, Bae et al. 2019). Deve ser considerando que ambos possuem características anatômicas, de fisiologia e genética semelhantes à dos humanos (Feng et al., 2012, Salamanca et al. 2015). Preferencialmente os ossos utilizados são retirados de áreas distantes de órgãos, como tíbia e de fêmur.

Com um número significativo de informações e de produtos disponibilizados no mercado, o profissional poderá encontrar dificuldade na seleção do substituto ósseo xenógeno adequado, capaz de contemplar sua necessidade. Por esta razão estudos comparativos entre os diferentes biomateriais tornam-se necessários. O presente estudo tem o objetivo avaliar por

análise imunistoquímica o reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico (DTC) provocados em calota craniana de ratos, preenchidos com dois biomateriais de origem bovina, sendo um destes uma hidroxiapatita bovina desproteïnizada (Bio-Oss<sup>®</sup>) e o outro de origem da matriz óssea inorgânica mineralizada (Bonefill).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Modelo experimental**

No presente estudo foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), machos, que apresentavam condições clínicas saudáveis para a realização do experimento. O peso médio de cada animal foi de 250-300 gramas e a idade aproximada de 3 meses. Todos os animais passaram por um processo de adaptação laboratorial sendo mantidos em ambiente climatizado com controle constante de temperatura ( $22 \pm 24^{\circ}\text{C}$ ), com ciclo de luz de 12 horas. Durante todo período da pesquisa foram mantidos em gaiolas plásticas com cinco animais cada uma, recebendo alimentação adequada e água *ad libitum*. A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Ceua) institucional (Unesp) e seguiu o guideline ARRIVE para estudos em animais (Kilkenny et al. 2010).

### **Cálculo amostral**

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado considerando três grupos de estudo avaliados em dois períodos. Foi realizado em um programa gratuito G Power versão 3.1.9.2, considerando um valor de alfa (erro tipo I) de 5%, valor de beta (erro tipo II) de 90%, e levado em consideração o teste estatístico ANOVA (teste utilizado para 3 ou mais grupos com medições realizadas em intervalos de tempo igualmente espaçados), com um tamanho de efeito considerado elevado ( $ES=0.5$ ). Foi determinada a necessidade de um total de 30 animais.

## **Procedimento cirúrgico**

Todos os animais receberam anestesia geral com a associação de 80 mg/kg de peso corporal de Cloridrato de Ketamina (Cetamin, Syntec do Brasil Ltd., Cotia, SP, Brazil) e 60 mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Xilazin, Syntec do Brasil Ltd., Cotia, SP, Brazil) aplicados pela via intramuscular em uma das pernas do animal. Quando necessário a complementação anestésica, foi aplicada uma dose equivalente a 50% da dose inicial. Após assepsia e tricotomia da calota foi realizada uma incisão semilunar e um retalho de espessura total foi deslocado. A seguir foi realizado a criação de um único defeito ósseo de tamanho crítico ( $\varnothing=5\text{mm}$ ) na porção central da calota, realizado com broca trefina (Dentoflex, Sistema de Implantes, São Paulo, SP, Brasil) montada em motor para implante com reduzida velocidade e sob irrigação abundante da área com solução salina fisiológica (0,9%). Foi realizado duas marcações em forma de "L" a partir da margem do defeito criado utilizando uma broca esférica nº. 2, distando 2 mm posterior e 2 mm anterior à margem do defeito, sendo que o seu eixo maior seguiu o plano sagital mediano do animal e serviam para orientação do processamento histológico e avaliação. A técnica de criação dos defeitos ósseos seguiu o protocolo de execução utilizado por outros autores (Nagata et al. 2009, Garcia et al. 2013, Garcia et al. 2014).

## **Tratamentos**

Os animais foram randomicamente separados em 3 grupos com 10 animais cada um, que receberam um dos seguintes tratamentos: Grupo C (n=10), os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo, denominado como grupo controle; Grupo Bio-Oss<sup>®</sup> (n=10), os defeitos foram preenchidos com hidroxapatita inorgânica extraída da porção medular da tíbia bovina, Bio-Oss<sup>®</sup> (Geistlich Pharma AG, Suíça); Grupo Bonefill (n=10), os defeitos foram preenchidos com matriz óssea inorgânica extraída de cortical de fêmur bovino, Bonefill (Bionnovation, São Paulo, Brasil). Os biomateriais foram inseridos nos defeitos ósseos até o seu completo

preenchimento, sem condensação excessiva. Todos os defeitos foram recobertos com membrana de cortical óssea bovina (GenDerm<sup>®</sup>, Baumer, São Paulo, Brasil). Ambos os biomateriais foram hidratados com solução salina fisiológica (0,9%) previamente à sua implantação na cavidade óssea. Suturas dos tecidos moles em todos os seus planos foram realizadas com fio reabsorvível (Vicryl 4-0, Ethicon, Johnson & Johnson, Somerville, NJ, EUA).

### **Processamento laboratorial**

Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados após 30 e 45 dias de pós-operatório, as calvárias dos animais contendo o defeito ósseo criado foram removidas e mantidas durante 48 horas em solução de formaldeído a 4%. A seguir foram lavadas em água corrente por 24 horas e iniciado o processo de descalcificação, realizada em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 16%. Constatada a descalcificação inicial, as peças anatômicas foram recortadas seguindo a orientação das demarcações em forma de "L" seguindo até a descalcificação final. Concluída a descalcificação, as peças foram lavadas, desidratadas, diafanizadas e incluídas em blocos de parafina. Foram realizados cortes seriados com 5 µm de espessura a partir do centro do defeito ósseo. Parte destes cortes foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e serviram para a análise histológica, enquanto a outra parte sofreu o processamento para análise imunoistoquímica

### **Análise imunoistoquímica**

Para a análise imunoistoquímica os cortes histológicos foram desparafinados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100° - 100° - 100° - 90° - 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada com as lâminas histológicas imersas em solução tampão citrato (Spring Bioscience), em câmara pressurizada (Decloaking chamber, Biocare Medical) a 95°C, por 20

minutos. No final de cada etapa as lâminas histológicas foram lavadas em tampão-fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4 (Sigma Aldrich). Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovino (Sigma Aldrich) por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena (Sigma Aldrich) e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em três lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-BMP2/4 do rato gerado em coelho (SC-9003, Santa Cruz Biotechnology), anti-OCN do rato gerado em camundongo (SC-365797, Santa Cruz Biotechnology) e anti-TRAP do rato gerado em camundongo (SC-376875, Santa Cruz Biotechnology). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado anti IgG de camundongo/coelho gerado cavalo por 2 horas (BA-1400, Vector Laboratories) e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP (SA-5004, Vector Laboratories) por 1 hora. A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (SK-4105, Vector Laboratories). Foi realizada a contracoloração com *Hematoxilina de Harris*, em seguida foi realizada a desidratação em etanol, diafanização em xilol e recobrimento com meio de montagem (Fisher Scientific) e lamínulas de vidro. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

A análise imunoistoquímica foi realizada por um histologista certificado e cego aos tratamentos realizados (EE). A região de interesse foi toda a extensão do defeito ósseo. Para BMP2/4 e OCN foi efetuada uma análise semi-quantitativa utilizando-se de uma secção histológica do centro do defeito ósseo de cada animal, no aumento original de 400x. Ao padrão de imunomarcção foi atribuído um escore. O critério adotado para o estabelecimento dos escores foi baseado e modificados daqueles estabelecidos por Theodoro et al. (2015), onde: Escore 0 = ausência de imunomarcção; Escore 1 = baixo padrão de imunomarcção (menos

de 1/3 das células imunorreativas e fraca marcação na matriz extracelular); Escore 2 = moderado padrão de imunomarcação (cerca de metade das células imunorreativas e moderada marcação na matriz extracelular); Escore 3 = alto padrão de imunomarcação (mais de 2/3 das células imunorreativas e forte marcação na matriz extracelular). Para avaliação da TRAP foi efetuada uma análise quantitativa utilizando-se de uma secção histológica do centro do defeito ósseo de cada animal, no aumento original de 400x. As células TRAP-positivas foram expressas por mm<sup>2</sup>.

### **Análise estatística**

Inicialmente foi avaliado a normalidade e homogeneidade dos dados. Nos dados obtidos de escores que avaliaram a proteína BMP2/4 e OCN foi aplicado o teste estatístico de Variância de Kruskal Wallis; Pós-teste de Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Aos valores obtidos na análise da imunomarcação da TRAP foram aplicados os testes Testes de normalidade de Shapiro-Wilk; Análise de Variância MANOVA; Pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

### **Análise imunoistoquímica**

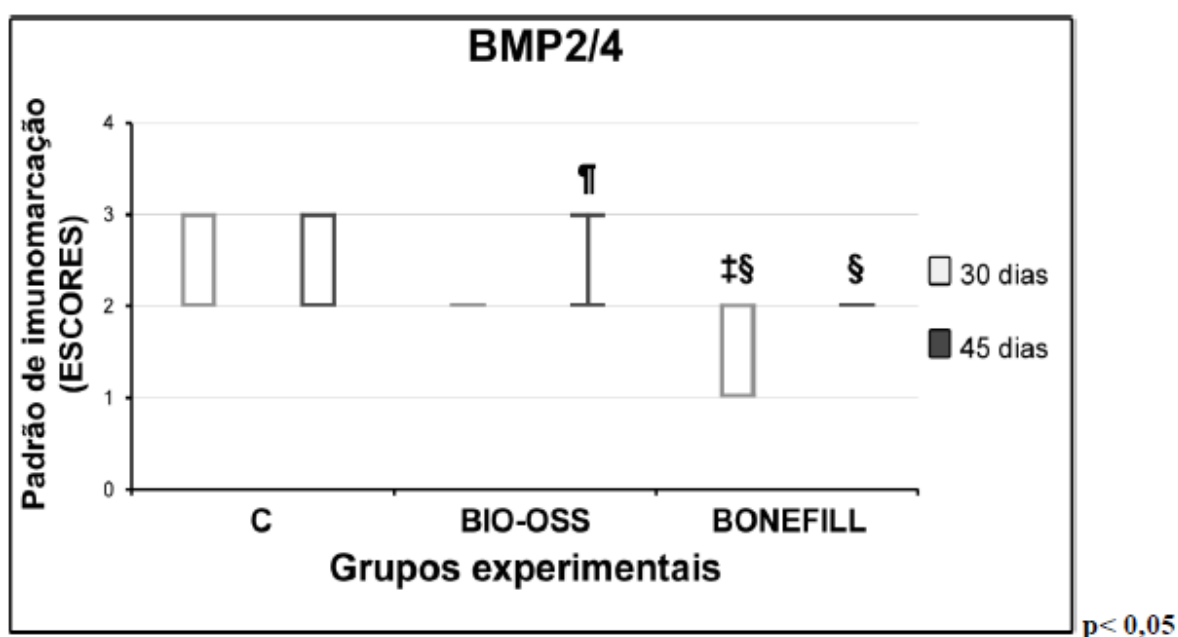
A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de BMP2/4, OCN e TRAP mostrou alta especificidade na detecção de tais proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação. As células imunorreativas apresentaram uma coloração marrom escura confinada exclusivamente ao citoplasma, no caso de TRAP, e confinada ao citoplasma e, em menor escala, à matriz extracelular, no caso de BMP2/4 e OCN.

Na análise da imunomarcação da proteína BMP2/4 e da OCN observa-se que as medianas dos espécimes dos grupos Controle e Bio-Oss® demonstraram similaridade de

resultados em ambos os períodos de avaliação, e que o Bio-Oss® demonstrou imunomarcagem no período de 45 dias, ligeiramente maior que a do grupo Bonefill (Figuras 1 e 3). A avaliação estatística dos escores está evidenciada nas figuras 2 e 4. Estes achados nos remetem a admitir que não houve diferenças significantes entre o grupo controle e os dois biomateriais avaliados, porém comparativamente, pode ser inferido que o Bio-Oss® resultou na formação de tecido ósseo mais maduro que o Bonefill em ambos os períodos de análise, com maior evidência aos 45 dias.

BMP 2/4							Mediana e desvio-padrão
C	30d	2	2	2	3	3	2 (2 – 3)
	45d	2	3	3	2	3	3 (2 – 3)
BioOss®	30d	2	2	2	2	2	2 (2 – 2)
	45d	3	3	3	2	3	3 (2 – 3)
Bonefill®	30d	2	2	2	1	1	2 (1 – 2)
	45d	2	2	2	2	2	2 (2 – 2)

**Figura 1.** Escores de imunomarcagem para BMP2/4 dos espécimes do grupo Controle, Bio-Oss® e Bonefill, e Mediana e desvio-padrão, nos períodos de 30 e 45 dias.

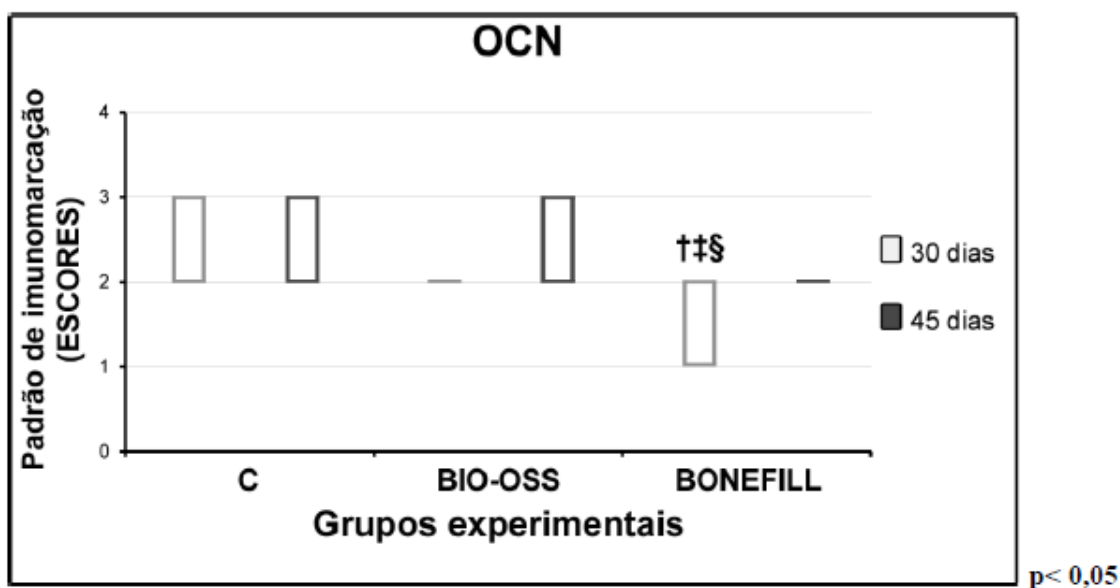


**Figura 2.** Análise estatística do padrão de imunomarcagem (Escore) para BMP2/4 nos defeitos ósseos nos grupos C, Bio-Oss® e Bonefill aos 30 e 45 dias pós-operatórios. Símbolos: +, diferença

estatisticamente significativa em relação ao grupo C aos 30 dias pós-operatórios; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C aos 45 dias pós-operatórios, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Bio-Oss® aos 30 dias pós-operatórios; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Bio-Oss® aos 45 dias pós-operatórios. Testes estatísticos: Análise de Variância de Kruskal Wallis; Pós-teste de Student-Newman-Keuls.

OCN							Mediana e desvio-padrão
C	30d	2	2	3	3	3	3 (2 – 3)
	45d	3	3	3	2	3	3 (2 – 3)
BioOss®	30d	2	2	2	2	2	2 (2 – 2)
	45d	3	3	2	2	3	3 (2 – 3)
Bonefill®	30d	1	1	2	2	1	1 (1 – 2)
	45d	2	2	2	2	2	2 (2 – 2)

**Figura 3.** Escores de imunomarcção para OCN dos espécimes do grupo C, Bio-Oss® e Bonefill, Mediana e desvio-padrão, nos períodos de 30 e 45 dias.



**Figura 4.** Análise estatística do padrão de imunomarcção (Escore) para OCN nos defeitos ósseos nos grupos C, Bio-Oss® e Bonefill aos 30 e 45 dias pós-operatórios. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C aos 30 dias pós-operatórios; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C aos 45 dias pós-operatórios; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Bio-Oss aos 45 dias pós-operatórios.

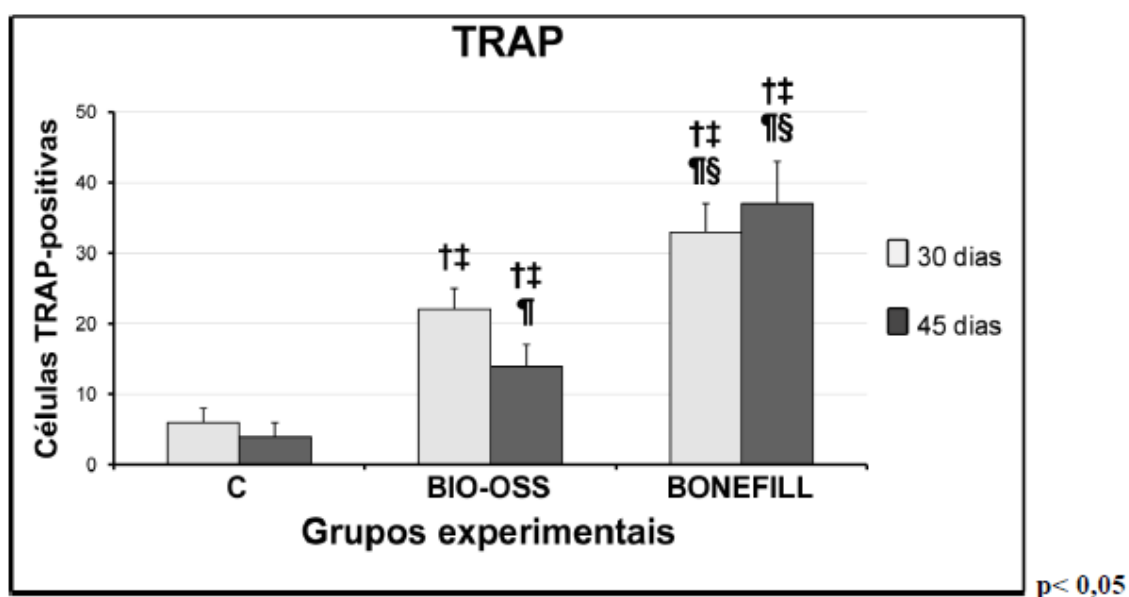
Na análise da imunomarcção da TRAP observa-se que os espécimes do grupo Bonefill apresentaram as maiores médias de imunomarcção em ambos os períodos ( $33,2 \pm 4,0$ ;  $37,2 \pm 6,4$ ); quando comparados com os do grupo Bio-Oss® e Controle nos mesmos períodos. Tal fato



denota que a reabsorção do biomaterial é mais demorada e, para isto, exige uma resposta inflamatória de maior duração (Figuras 5 e 6).

TRAP							Média e desvio-padrão
C	30d	4	7	6	5	9	6,2 ± 1,9
	45d	3	2	4	4	7	4,0 ± 1,9
BioOss®	30d	22	27	19	21	22	22,2 ± 2,9
	45d	18	14	12	10	16	14,0 ± 3,2
Bonefill®	30d	32	28	34	39	33	33,2 ± 4,0
	45d	29	32	41	40	44	37,2 ± 6,4

**Figura 5.** Escores da imunomarcção para TRAP dos espécimes do grupo C, Bio-Oss® e Bonefill, e Média e desvio-padrão, nos períodos de 30 e 45 dias.



**Figura 6.** Análise estatística da quantidade de células TRAP-positivas nos defeitos ósseos nos grupos C, Bio-Oss® e Bonefill aos 30 e 45 dias pós-operatórios. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C aos 30 dias pós-operatórios; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C aos 45 dias pós-operatórios; †‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Bio-Oss® aos 30 dias pós-operatórios; †§, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Bio-Oss® aos 45 dias pós-operatórios. Testes estatísticos: Teste de normalidade de Shapiro-Wilk; Análise de Variância MANOVA; Pós-teste de Tukey.

## DISCUSSÃO

O presente estudo está apresentado de acordo com o guideline ARRIVE para estudos em animais (Kilkenny et al. 2010) e avaliou imunistoquimicamente o reparo de defeitos ósseos provocados em calvárias de ratos preenchidos com dois substitutos ósseo de origem bovina, um destes, derivado da matriz óssea medular de tíbia desproteinizada, comercialmente denominado de Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG, Suíça) e outro derivado da cortical de fêmur bovino desproteinizado, o Bonefill (Bionnovation, São Paulo, Brasil).

É significativo o número de pesquisas que utilizaram animais em experimentos. Isto se deve ao fato de que eles possibilitam o desenvolvimento de modelos experimentais capazes de responder satisfatoriamente hipóteses que encontrariam dificuldades éticas para sua realização em seres humanos. Os animais roedores têm sido empregados, como coelhos, porco-da-índia, camundongos e ratos. Entre estes destaca-se o uso de espécies de ratos que possuem sistema imunológico normal como o rato Sprague-Dawley e o Wistar (Acarturk and Hollinger, 2006). O rato é o mais utilizado por constituírem-se em uma espécie de fácil obtenção, de reduzido custo, possibilitar uma amostra homogênea, ser de fácil manuseio e possuírem anatomia e resposta biológica similares à dos humanos (Klausen, 1991; Graves et al., 2008, Oz and Puleo, 2011). Além disso, estes animais permitem o desenvolvimento de diferentes modelos experimentais, como o de reparo de alvéolos dentais (Saito et al. 2011, Hassumi et al. 2018), de doença periodontal (Garcia et al., 2014, Garcia et al., 2018), fratura óssea (Sigurdson et al. 2011, Reikeras et al. 2015), defeitos em tíbias (Garavello-Freitas et al. 2003), fêmur (Dubrov et al. 2019), ramo mandibular (Teixeira et al. 1999) e em calota craniana (Garcia et al. 2013, Garcia et al. 2014). Permitem avaliar tratamentos, modificações sistêmicas e uso de drogas (Garcia et al. 2018, Statkiewicz et al. 2018, Ervolino et al. 2019).

Defeitos ósseos criados em calota craniana de ratos representa um dos modelos mais utilizados para regeneração óssea com uso de enxertos ósseos ou substitutos ósseos, pois a área

possui reduzido stress mecânico, sem interferência muscular, adequada estabilidade das estruturas vizinhas, presença de tecido cortical e medular, reduzido suprimento vascular, pobre regeneração óssea, e permite avaliar a interação do material implantado com o osso original e o tecido neoformado (Mankani et al., 2006, Liu and Lv, 2018). Este procedimento foi proposto por Freeman & Turnbull (1973) que realizou criação de defeitos com uma fresa de 2 mm de diâmetro. Este relato despertou entre os pesquisadores a necessidade de se criar defeitos ósseos que não conseguiriam uma regeneração natural e espontânea no período previsto para a completa regeneração, ou seja, um defeito de tamanho crítico (DTC) (Schmitz and Hollinger, 1986).

Diferentes pesquisas foram realizadas com defeitos ósseos criados com diferentes diâmetros: de 3,8 mm (Honma et al., 2008), 5 mm (Turonis et al., 2006; Artzi et al., 2008; Nagata et al., 2013), 8 mm (Lim et al., 2000; Matzenbacher et al., 2003; Pang et al., 2004; Messori et al., 2008; Park et al., 2009), 8,8 mm (Honma et al., 2008), 12 mm (Herculiani et al., 2000). Em nossa pesquisa foi utilizado DTC de 5 mm de diâmetro por ser considerado um defeito crítico que não há regeneração óssea completa espontânea, podendo ser inclusive ser realizado bilateralmente em calotas (Vajgel et al., 2014).

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que a imunomarcagem para BMP2/4 e de OCN nos espécimes do grupo Controle, onde a cavidade óssea não recebeu nenhum preenchimento, permanecendo recoberta com membrana de cortical óssea bovina, demonstraram similaridade de resultados com os do grupo Bio-Oss<sup>®</sup>, nos dois períodos de avaliação. Este fato fortalece a importância da neoangiogênese da área após injúria, a adesão de plaquetas e liberação de mediadores como o fator de crescimento transformador beta ( $\beta$ -TGF) e estimulação das células mesenquimais, que constituem fatores importantes para que ocorra a reparação óssea. Na análise comparativa entre os biomateriais pode ser observado que ambos demonstraram capacidade de neoformação óssea, porém o Bio-Oss<sup>®</sup> demonstrou

imunomarcacão ligeiramente maior que a do Bonefill em ambos os períodos avaliados, destacando-se no período de 45 dias (Fig. 1, 2, 3 e 4). Também neste estudo ficou evidenciado que o Bonefill mostrou maior atividade de reabsorção, caracterizado pelo maior número de células TRAP-positivas em ambos os períodos de avaliação. Este fato corrobora os achados de outros estudos que salientam que a matriz inorgânica derivada de osso bovino poderá sofrer reabsorção lenta, provocando em consequência, uma significativa resposta inflamatória (Sassioto et al., 2003).

Sabe-se que as proteínas ósseas morfogenéticas são fontes de crescimento ósseo que constituem a grande família do fator de crescimento transformador beta ( $\beta$ -TGF) sendo que a BMP 2 e a BMP4 possuem aminoácidos idênticos (92%) e efeitos biológicos similares (Lee 1997) destacando-se entre estes sua capacidade osteoindutora, promovendo a osteogênese pela estimulação de células mesenquimais indiferenciadas a diferenciarem-se em osteoblastos (Cheng et al. 2003).

Diferentes fatores podem ter contribuído para os achados desta pesquisa. Entre estes, provavelmente se deve ao processo de purificação do material biológico, pois um desses é obtido a partir de sucessivos tratamentos químicos (Bonefill) enquanto o outro, a partir de temperatura de 300° C e sinterizado a 1.100° C (Bio-Oss®). A influência de outros fatores e condições como tensão de oxigênio na área, vascularização limitada, fatores próprios das condições do animal (idade, sexo, cálcio, fósforo, calcitonina, desnutrição proteica, vitaminas) podem também ter contribuído (Sassioto et al., 2004).

Por outro lado, o modelo de DTC em calvária empregado no presente estudo mostrou-se efetivo e adequado para os objetivos da pesquisa, que evidenciou que ambos os biomateriais apresentaram resposta biológica semelhante, com ligeiros benefícios para o biomaterial Bio-Oss®. Dentre as limitações do estudo, destaca-se o número de animais por grupo e os períodos de avaliações empregados. O presente estudo procurou seguir o número de animais

preconizados em pesquisas anteriores, bem como o princípio da experimentação animal dos 3 Rs “replace; reduction; refinement” (Kilkenny et al. 2010) em relação aos períodos de avaliação. Procurou-se avaliar a fase inflamatória e início da fase proliferativa do reparo ósseo (30 dias) sem deixar de seguir períodos de avaliação frequentemente utilizados na literatura, de 1, 2, 3, 4, 8, 12, 36 semanas (Freeman & Turnbull, 1973, Honma et al., 2008, Matzenbacher et al., 2003, Artzi et al., 2008).

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com a metodologia utilizada no presente estudo, permitiram concluir que ambos os biomateriais se mostraram biocompatíveis; que não houve diferenças estatísticas significantes em relação ao grupo controle; porém entre os biomateriais avaliados, o Bio-Oss® mostrou, em ambos os períodos de avaliação, resultados com tendência de melhor reparo quando comparado com o Bonefill, com maior evidência aos 45 dias.

## REFERÊNCIAS

1. Betz RR. Limitations of autograft and allograft: New synthetic solutions. *Orthopedics*. 2002 May;25(5 Suppl): s561-70.
2. Graham SM, Leonidou A, Aslam-Pervez N, Hamza A, Panteliadis P, Heliotis M, et al.: Biological therapy of bone defects: the immunology of bone allo-transplantation. *Expert Opin Biol Ther*. 2010 Jun;10(6):885-901.
3. Takami M, Mochizuki A, Yamada A, Tachi K, Zhao B, Miyamoto Y, et al. Osteoclast differentiation induced by synthetic octacalcium phosphate through receptor activator of NF-kappa-B ligand expression in osteoblasts. *Tissue Eng Part A*. 2009 Dec;15(12):3991-4000.
4. Tovarv N, Jimbo R, Gangolli R, Perez L, Manne L, Yoo D et al. Evaluation of bone response to various anorganic bovine bone xenografts: an experimental calvaria defect study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Feb;43(2):251-60.
5. Wang W, Yeung KW. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: a review. *Bioact Mater*. 2017 Jun 7;2(4):224-247.
6. Juodzbaly G, Wang HL. Soft and hard tissue assessment of immediate implant placement: a case series. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Apr;18(2):237-43.

7. Ferreira CEA, Novaes Jr. AB, Haraszthy VI, Bittencourt M, Martinelli CB, Luczyszyn CM. A clinical study of 406 sinus augmentations with 100% anorganic bovine bone. *J Periodontol* 80. 2009 Dec;80(12):1920-7.
8. Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 21. 2010 Jul;21(7):688-98.
9. Araújo MG, Liljenberg B, Lindhe J. Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Jan;21(1):55-64.
10. Sbordone C, Toti P, Martuscelli R, Guidetti F, Ramaglia L, Sbordone L. Retrospective volume analysis of bone remodeling after tooth extraction with and without deproteinized bovine bone mineral insertion. *Clin Oral Implants Res*. 2016 Sep;27(9):1152-9.
11. Maiorana C, Poli PP, Deflorian M et al. Alveolar socket preservation with demineralised bovine bone mineral and a collagen matrix. *J Periodontal Implant Sci*. 2017 Aug;47(4):194-210.
12. Stacchi C, Lombardi T, Oreglia F, Alberghini MA, Traini T. Histologic and Histomorphometric Comparison between Sintered Nanohydroxyapatite and Anorganic Bovine Xenograft in Maxillary Sinus Grafting: A Split-Mouth Randomized Controlled Clinical Trial. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9489825.
13. Bracey D, Seyler T, Jinnah, A, Lively M, Willey J, Smith T et al. A decellularized porcine xenograft-derived bone scaffold for clinical use as a bone graft substitute: a critical evaluation of processing and structure. *J Funct Biomater*. 2018 Jul 12;9(3):45.
14. Gao Y, Cao WL, Wang XY, Gong YD, Tian JM, Zhao NM, et al. Characterization and osteoblast-like cell compatibility of porous scaffolds: Bovine hydroxyapatite and novel hydroxyapatite artificial bone. *J Mater Sci Mater Med*. 2006 Sep;17(9):815-23
15. Mahyudin F, Utomo DN, Suroto H, Martanto TW, Edward M, Gaol IL. Comparative effectiveness of bone grafting using xenograft freeze-dried cortical bovine, allograft freeze-dried cortical new zealand white rabbit, xenograft hydroxyapatite bovine, and xenograft demineralized bone matrix bovine in bone defect of femoral diaphysis of white rabbit: experimental study in vivo. *Int J Biomater*. 2017;2017:7571523.
16. Salamanca E, Lee WF, Lin CY, Huang HM, Lin CT, Feng SW, Chang WJ. A novel porcine graft for regeneration of bone defects. *Materials*. 2015;8(5):2523-2536.
17. Bracey DN, Seyler TM, Jinnah AH et al. A porcine xenograft-derived bone scaffold is a biocompatible bone graft substitute: An assessment of cytocompatibility and the alpha-Gal epitope. *Xenotransplantation*.
18. Bae EB, Kim HJ, Ahn JJ, Bae HY, Kim HJ, Huh JB. Comparison of bone regeneration between porcine-derived and bovine-derived xenografts in rat calvarial defects: a non-inferiority study. *Materials (Basel)*. 2019 Oct 18;12(20):3412.

19. Feng W, Fu L, Liu J, Li D. The expression and distribution of xenogeneic targeted antigens on porcine bone tissue. *Transplant. Proc.* 2012 Jun;44(5):1419-22.
20. Nagata MJH, Melo LGN, Messora MR, Bomfim SRM, Fucini SE, Garcia VG. Effect of platelet-rich plasma on bone healing of autogenous bone grafts in critical-size defects. *J Clin Periodontol.* 2009 Sep;36(9):775-83.
21. Garcia VG, da Conceição JM, Fernandes LA, Almeida JM, Nagata MJH, Bosco AF et al. Effects of LLLT in combination with bisphosphonate on bone healing in critical size defects: a histological and histometric study in rat calvaria. *Lasers Med Sci.* 2013 Feb;28(2):407-14.
22. Garcia VG, Sahyon AS, Longo M, Fernandezs LA, de Almeida JM, Novaes VCN et al.: Effect of LLLT on autogenous bone grafts in the repair of critical size defects in the calvaria of immunosuppressed rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 42:1196-1202, 2014.
23. Theodoro LH, Caiado RC, Longo M, Novaes VC, Zanini NA, Ervolino E et al. Effectiveness of the diode laser in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats: a histopathological, histometric, and immunohistochemical study. *Lasers Med Sci.* 2015 May;30(4):1209-18.
24. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother.* 2010 Jun 29;8(6):e1000412.
25. Acarturk TO, Hollinger JO. Commercially available demineralized bone matrix compositions to regenerate calvarial critical-sized bone defects. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 118(4):862-873.
26. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol.* 1991;62:59-73.
27. Graves DT, Fine D, Teng YTA, Van Dyke TE, Hajishengallis, G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2008;35(2):89-105.
28. Oz HS, Puleo DA: Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotech.* 2011;754857.
29. Saito CT, Gulinelli JL, Panzarini SR, Garcia VG, Okamoto T, Sonoda CK et al. Effect of low-level laser therapy on the healing process after tooth replantation: a histomorphometrical and immunohistochemical analysis. *Dent Traumatol.* 2011;27(1):30-39.
30. Hassumi JS, Mulinari-Santos G, Fabris ALDS, Jacob RGM, Gonçalves A, Rossi AC. et al.: Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e2017036.
31. Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJH, Ervolino E et al.: Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2014;49(5):584-594.

32. Garcia VG, Gualberto EC Júnior, Ervolino E, Nagata MJH, de Almeida JM, Theodoro LH. aPDT for periodontitis treatment in ovariectomized rats under systemic nicotine. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;22:70-78.
33. Sigurdson U, Reikeras O, Utvag SE. The influence of compression on the healing of experimental tibial fractures. *Injury.* 2011;42(10):1152-1156.
34. Reikeras O, Winge MI, Røkkum M. Effect of soft-tissue attachment on tibial fracture healing in rats. *J Orthop Surg (Hong Kong).* 2015;23(1):47-51.
35. Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Hofling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2003;70(2):81-89.
36. Dubrov VE, Klimashina ES, Shcherbakov IM, Shipunov GA, Putlyaev VI, Evdokimov PV et al. Experimental evaluation of the properties of 3D porous bone substitute based on calcium phosphate on the model of monocortical diaphyseal femur defect in rats. *Bull Exp Biol Med.* 2019;167(3):400-403.
37. Teixeira HM, Ramalho LTO. Reação da resina vegetal de mamona durante o processo de reparo em defeitos ósseos induzidos no corpo da mandíbula. *Rev Odontol UNESP;* 1999;28(1):49-61.
38. Statkiewicz C, Toro LF, de Mello-Neto JM et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2018;184:7-17.
39. Ervolino E, Statkiewicz C, Toro LF, Mello-Neto JM, Cavazana TG, Issa JPM et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone.* 2019;120:101-113.
40. Mankani MH, Kuznetsov SA, Wolfe RM, Marshall GW, Robey PG. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarial and mandible. *Stem Cells.* 2006;24:2140-2149.
41. Liu M, Lv Y. Reconstructing bone with natural bone graft: a review of in vivo studies in a bone defect animal model. *Nanomaterials (Basel).* 2018;8(12):999.
42. Freeman E, Turnbull RS. The value of osseous coagulum as a graft material. *J Periodont Res.* 1973;8:229-236.
43. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomaxillofacial nonunions. *Clin Orthopedics Related Res.* 1986;205:299-308.
44. Honma T, Itagaki T, Nakamura M, Kamakura S, Takahashi I, Echigo S, Sasano Y. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral Dis.* 2008;14:457-464., 2008.



45. Turonis JW, McPherson JC, Cuenin MF, Hokett SD, Peacock ME, Sharawy M. The effect of residual calcium in decalcified freeze-dried bone allograft in a critical- sized defect in the rattus norvegicus calvarium. *J Oral Implant.* 2006;32:55 62.
46. Artzi Z, Koozlovsky A, Nemcovsky CE, Moses O, Tal H, Rohrer MD et al. Histomorphometric evaluation of natural minerals combined with synthetic cell-binding peptide (P-15) in critical-sized defects in the rat calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2008;23:1063 1070.
47. Nagata MJ, Santinoni CS, Pola NM, de Campos N, Messora MR, Bomfim SR, Ervolino E, Fucini SE, Faleiros PL, Garcia VG, Bosco AF. Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: a new therapeutic approach to enhance bone healing. *J Photochem Photobiol B.* 2013 Apr 5;121:6-14.
48. Lim SC, Lee, MJ, Yeo HH. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. *Path Intern.* 2000;50:594 602., 2000.
49. Matzenbacher SA, Mailhot JM, McPherson JC, Cuenin MF, Hokett SD, Sharawy M et al. In vivo effectiveness of a glycerol-compounded demineralized freeze-dried bone xenograft in the rat calvarium. *J Periodont.* 2003;74:1641 1646., 2003.
50. Pang EK, Im SU, Kim CS, Choi SH, Chai JK, Kim CK et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 dose on bone formation in a rat calvarial defect model. *J Periodontol.* 2004;75:1364 1370.
51. Messora MR, Nagata MJ, Dornelles RC, Bomfim SR, Furlaneto FA, de Melo LG, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res.* 2008 Dec;43(6):723-729.
52. Park JW, Jang JH, Bae SR, An CH, Suh JY. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defects. *Clin Oral Impl Res.* 2009;20:372 378.
53. Herculiani PP, Cestari TM, Taga EM, Taga R. Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. *Rev Bras Implant.* 2000;6:7 14.
54. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25:879 893.
55. Sassioto MCP, Massaschi CM, Aydos RD, Silva AR, Takita LC, Figueiredo MJPS, Bueno TAAO. Estudo morfológico do reparo de defeito ósseo preenchido com enxerto ósseo autógeno ou matriz óssea bovina, em ratos. *Ensaio Ci.* 2003;7:543 550.
56. Lee MM. Bone morphogenetic proteins. *J Clin Periodont.* 1997;24:355 365.
57. Cheng H, Jiang W, Philips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *The Journal of Bone and Joint Surgery.* 2003;85:1544- 1552.

58. Sassioto MCP, Inouye CM, Aydos RD, de Figueiredo AS, Pontes ERJC, Takita LC. Estudo do reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada e calcitonina em ratos. *Acta Cir Bras.* 2004;19:495-503., 2004.

## ANEXO

## Comitê de Ética em Pesquisa




UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO REPARO EM DEFEITOS DO TAMANHO CRÍTICO CRIADOS EM CALVÁRIA DE RATOS, REALIZADOS COM BROCA TREFINA OU INSTRUMENTO PIEZOELÉTRICO, PREENCHIDOS COM OSSO BOVINO"** sob responsabilidade do(a) **Pesquisador(a) Valdir Gouveia Garcia** e o colaborador **Luis Augusto Lordêlo Bury** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela CEUA em 01/07/2011 de acordo com o Processo 1200/2011.

Araçatuba, 04 de Julho de 2011



**João Eduardo Gomes Filho**  
Presidente da CEUA

FAC/wbm.

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba – SP  
Tel (18) 3636- 1350 Fax (18) 3636- 1352 E-mail: dapsa@fmva.unesp.br

## APÊNDICE

### Guideline do periódico JOURNAL OF CRANIO MAXILLOFACIAL SURGERY



## JOURNAL OF CRANIO-MAXILLOFACIAL SURGERY

Official publication of European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery

### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 1010-5182

#### DESCRIPTION

The *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* publishes articles covering all aspects of **surgery** of the **head, face and jaw**. Specific topics covered recently have included:

- Distraction osteogenesis
- Synthetic bone substitutes
- Fibroblast growth factors
- Fetal wound healing
- Skull base surgery
- Computer-assisted surgery
- Vascularized bone grafts

You can now submit your paper online to the *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* via the online submission and editorial system from Elsevier. Please visit <http://www.ees.elsevier.com/jcms/>

#### Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

#### IMPACT FACTOR

2018: 1.942 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2019

## Artigo científico 2

Artigo de acordo com as normas da Faculdade ILAPEO, para futura publicação no periódico  
**EC DENTAL SCIENCE**

# **DIGITAL WORKFLOW REHABILITATION IN SHORT IMPLANTS ASSOCIATED WITH GINGIVAL GRAFTS**

**Gizelli de Souza<sup>1</sup>**  
**Lizandra Lopes Comparin<sup>1</sup>**  
**Thiago Tatim<sup>1</sup>**  
**Tatiana Deliberador<sup>2</sup>**  
**Valdir Gouveia Garcia<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> **Private Practice, MSC Student of Latin American Institute of Dental Research and Education, ILAPEO, Curitiba, PR, Brazil**

<sup>2</sup> **Professor of Latin American Institute of Dental Research and Education, ILAPEO, Curitiba, PR, Brazil**

## **ABSTRACT**

The success of rehabilitation with implants depends on a global planning, involving procedures in soft and hard tissues that aim at the possibility of performing a prosthetic rehabilitation with good aesthetic and functional results. This case is intended to report a clinical case of oral rehabilitation on short implants, in the posterior region of the mandible, associated with the Digital Workflow and alteration of the gingival phenotype with Free Gingival Grafts on the right side and Subepithelial Connective Tissue Graft on the left side. The association between the use of short implants, change in gingival phenotype and digital flow proved to be favorable procedures in the rehabilitation of the posterior region of the mandible, resulting in increased predictability of the result and satisfaction with the treatment.

**Keywords:** Computer Assisted Design; CAD CAM; Workflow; Dental Implants; Connective Tissue; Tissue Graft; Dental Prosthesis, Implant-Supported.

## **INTRODUCTION**

The rehabilitation of partially edentulous patients is considerably complex and must combine high predictability and low morbidity, in addition to reaching the patient's expectations [1]. The pattern of bone loss after tooth extraction in the posterior region of the upper and lower arches is quite distinct. In the mandible, this loss occurs mainly in the vertical

direction [2]. Due to this, and the presence of noble anatomical areas, planning for rehabilitation of the posterior region of the atrophic arches usually requires specific treatment alternatives [3].

When the residual bone height over the mandibular canal is reduced, studies [3-6] consider short implants as a preferable option due to the reduction in treatment time, cost and morbidity in the face of reconstructive and/or more complex surgical procedures. Currently, those with  $\leq 6$  mm are defined as short implants [7,8]. However, the importance of maintaining bone tissue in rehabilitation with this type of implant is highlighted, since its impairment can lead to a relatively greater impact on support when compared to marginal bone loss in implants of greater length [2]. In this scenario, attention is focused on procedures aimed at the integrity of peri-implant tissues. Currently, attention to the gingival phenotype is evidenced in the literature, considering the quality and quantity of keratinized tissue around the implants and possible needs for surgical procedures for manipulation of peri-implant tissues, preferably in pre or trans-surgical stages of installation of the implants, aiming at tissue stability and treatment longevity [9-13].

In addition to the development of successful surgical processes, it is essential to search for technological advances that favor a quality rehabilitative result, which deliver safety and predictability for both the professional and the patient, in order to obtain satisfaction with the treatment [14,15]. In this context, the use of Digital Flow processes is emphasized, which is becoming more and more present in the clinical routine [15,16]. CAD/CAM (Computer-aided-design/Computer-aided-manufacturing) systems offer an alternative to the processing of indirect dental restorations and fixed dental prostheses. The use of digitized prints eliminates a series of clinical and laboratory steps, leading to fast and effective delivery of the final personalized device [14].

## Objective of the Study

The objective of this work is to report a clinical case of oral rehabilitation on short implants, in the posterior region of the mandible, associated with the Digital Flow and alteration of the gingival phenotype.

## CASE REPORT

A 56-year-old woman, ASA II, attended the clinic of Master in Dentistry at Latin American Dental Research and Teaching Institute - ILAPEO - (Curitiba, PR, Brazil), with an indication of prosthetic rehabilitation on implants.

Upon clinical examination and evaluation of the imaging exams of the lower arch, Morse Cone (CM) type implants (NEODENT™, Curitiba, PR, Brazil) were observed, installed in the regions of the teeth 35 (TITAMAX® CM Cortical 3.5 x 7 mm) and 36 (TITAMAX WS® CM Cortical 5 x 5 mm), on which NEODENT™ gingival healers were installed; 44 (TITAMAX® CM Cortical, 3.5 x 7 mm), 46 (TITAMAX WS® CM Cortical 4 x 5 mm) and 47 (TITAMAX WS® CM Cortical 5 x 5 mm). Implants 44, 46 and 47 were submerged. Also noteworthy was the presence of a thin periodontal phenotype with a predominance of alveolar mucosa in the right (Figure 1a) and left (Figure 1b) edentulous regions of the lower arch.



**Figure 1:** (a) Right side: thin periodontal phenotype and submerged lower implants.



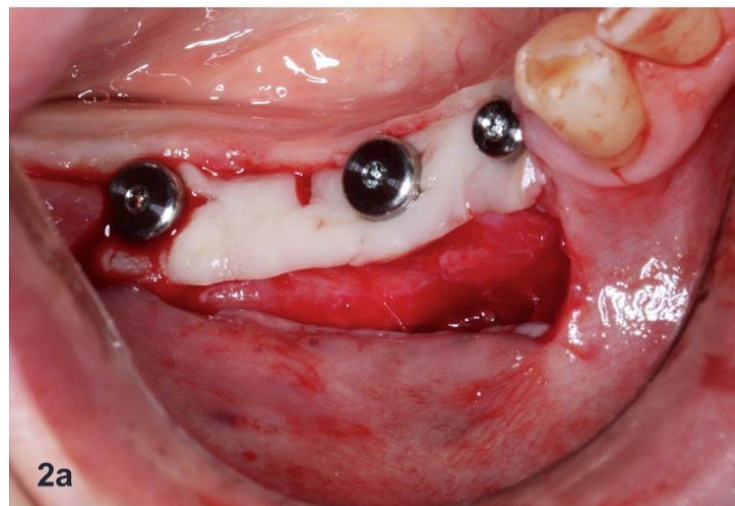
**Figure 1:** (b) Left side: thin periodontal phenotype and implants with installed gingival healers.

Through the Diagnostic Planning process, using the assembly of the arch models in a semi-adjustable articulator, the prosthetic rehabilitation of the lower arch was defined through the construction of prostheses on bilateral implants, made of metal-ceramic material, by a screwed system, through CAD-CAM digital flow. Clinically, the need to change the periodontal phenotype (autogenous gingival grafts) in the regions of pre-existing lower implants was identified. For the upper arch, we opted for rehabilitation through prosthesis over dento-gingival implants of the hybrid type, screwed.

Periodontal surgeries, performed in different stages, were defined according to the clinical indications on each side of the arch. For the right side (region 44 to 47), where the implants were submerged, the Free Gingival Graft (FGG) was indicated due to the need to increase the attached gingival band. In the FGG procedure, it was decided to perform the trans-operative selection of gingival healers, using them as an auxiliary means of fixation and immobilization of the grafted tissue. After obtaining the tissue from the palate, with width and length defined by a surgical map and about 2 mm thick, it was transported to the recipient area previously prepared in a divided flap. Blades 15c were used for both incisions. The position of the implants was marked in the transplanted tissue before fixation, through perforations, and in



this place, “X” incisions were made to adapt the gingival healers. Small relaxing incisions were made on the margins to facilitate the extension and adaptation of the tissue and the gingival healers on the implants. After the healers were positioned in the tissue, the set was fixed on the implants and additional stabilization sutures were performed (Figure 2a and 2b). After 10 days, the sutures were removed and 60 days after the operation, an increase in the keratinized gingiva band was observed (Figure 2c).



**Figure 2:** (a) Gingival tissue from the palate, transfixed by the gingival healers and fixed over the connective tissue of the ridge. Small marginal relaxing incisions facilitate the positioning of the transplanted tissue on the recipient bed.

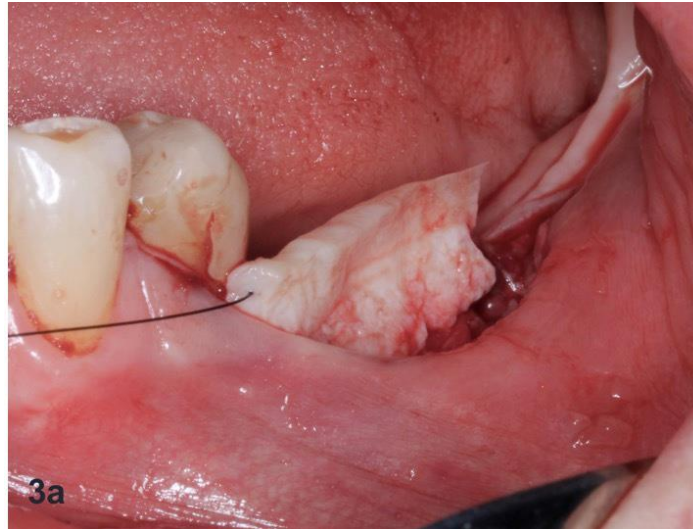


**Figure 2:** (b) Additional fixation of the transplanted tissue by sutures.



**Figure 2:** (c) 60 days after surgery. Note the increase in the width of the keratinized gingiva band.

For the left side (region 35 and 36), where the gingival healers were already installed, with the presence of a keratinized gingiva band of 2 mm width and 1.5 mm thickness, the Subepithelial Connective Tissue Graft (SCTG) was indicated with the aim of increasing tissue thickness. In the SCTG procedure, it was decided to obtain connective tissue using a double-blade scalpel, with two 15c blades. The donor area chosen was the region of the alveolar crest of the upper border, on the left side. The upper part of the graft was not de-epithelialized, with the keratinized gingiva band maintained and juxtaposed to the gingival healers, and the connective tissue positioned in the recipient area previously prepared by a flap divided and stabilized by sutures (Figure 3a and 3b). After 10 days, the sutures were removed and 60 days after the operation, there was a gain in keratinized tissue and a slight increase in tissue volume (Figure 3c).



**Figure 3:** (a) Adaptation of non-de-epithelialized connective tissue, originating from the alveolar ridge and removed with a double-bladed scalpel, in the receiving bed prepared by a split-flap.



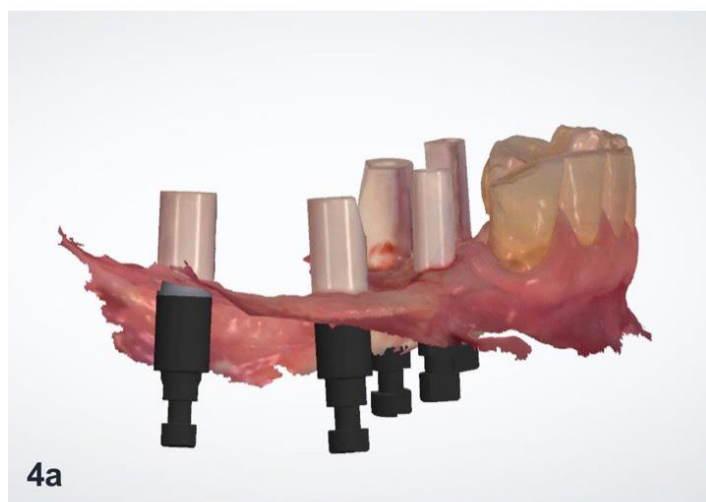
**Figure 3:** (b) Fixation of the transplanted tissue by sutures. (c) 60 days after surgery. There is an increase in the width of the keratinized gingiva band and a slight increase in the thickness of the connective tissue.



**Figure 3:** (c) 60 days after surgery. There is an increase in the width of the keratinized gingiva band and a slight increase in the thickness of the connective tissue.

In both surgical techniques, the gingival healers were maintained for at least 60 days, before prosthetic rehabilitation began. To make the provisionals, the gingival healers were removed and the NEODENT™ prosthetic abutments were selected and installed (35 and 44 CM micro abutments); (36, 46 and 47 WS conical mini abutments). Subsequently, NEODENT™ intraoral scan or scan body transfers, specific for each type of abutment, were installed (35 and 44 transfer for CM micro abutments); (36, 46 and 47 transfers for CM mini abutments), to obtain images.

The scanning for making the provisionals was carried out using the TRIOS® intraoral scanner (3Shape™, Copenhagen, Denmark), obtaining the “STL” type image of the lower arch (with emphasis on the peri-implant gingiva and prosthetic pillars), lower arch with scan-bodies in position (Figure 4a), upper arch and, finally, recording of the occlusion. The files were sent to the digital prosthesis laboratory for digital planning and making provisional prostheses in milled resin, with four elements joined on the right side (44-45-46-47) (Figure 4b) and two elements joined on the left side (35-36). The crowns received were repackaged in the mouth on titanium cylinders, keeping the screw opening with Teflon protection. After being attached to the cylinders, the crowns were screwed over the micro and mini abutments. At the time of fitting the provisionals, the upper arch had already been rehabilitated with a full arch prosthesis on implants (Figure 5a and 5b).



**Figure 4:** (a) Digital image for planning temporary crowns, obtained by TRIOS® Scanner, with scanbodies in position. The abutments analogs are digitally inserted in the Prosthesis Laboratory, through planning software.



**Figure 4:** (b) Digitally planned prostheses, with the determination of occlusion.

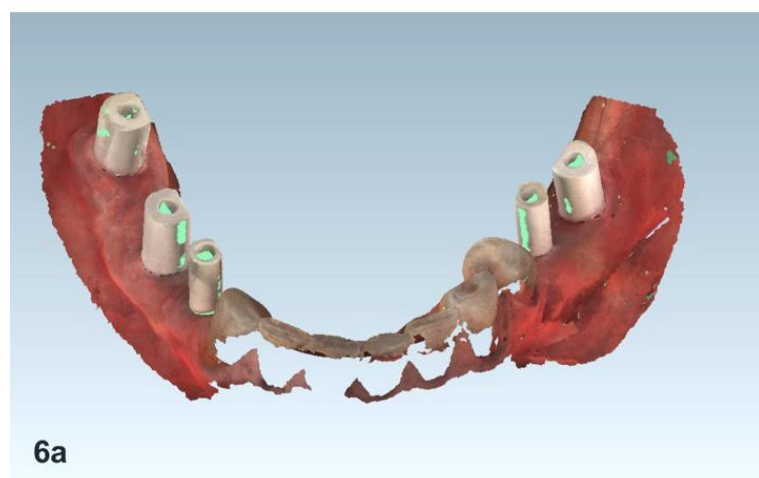


**Figure 5:** (a) Temporary prostheses from elements 44 to 47, made by milling, already installed in the mouth, in occlusion with the upper prosthesis. Note the change in the gingival phenotype obtained by the EGL surgery.

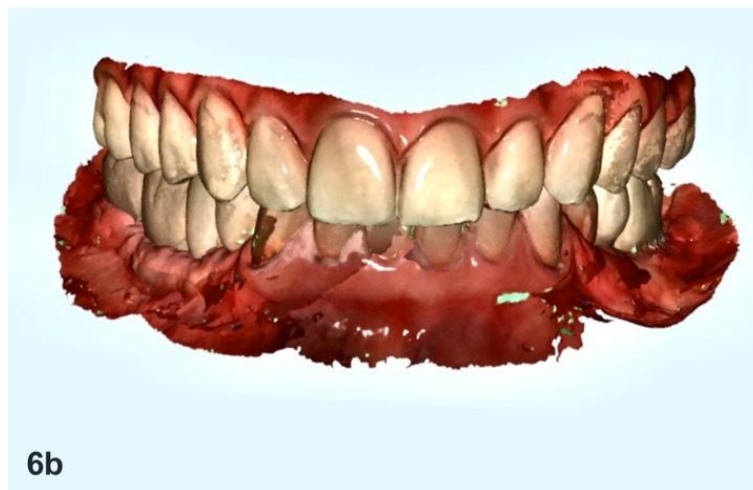


**Figure 5:** (b) Milled provisional prostheses from elements 35 and 36 were installed in the mouth, in occlusion with the upper prosthesis. Note the change in the gingival phenotype obtained by ECSE

A new intraoral scan and a new digital occlusion record were made for the construction of the final prosthesis using the VIRTUO VIVO® Scanner (Dental Wings™, Montreal, Canada), through the steps of scanning the lower arch with the provisional prostheses; removal of provisionals and scanning of the gingival profile, installation and scanning of scan bodies (Figure 6a), followed by scanning the upper arch and occlusion (with provisionals in position) (Figure 6b). The digital files were sent to the digital prosthesis laboratory for the planning and execution of the definitive elements, made of metal-ceramic. The CrCo metal infrastructures were carried out using the milling technique (Figure 7) and tested in the mouth.



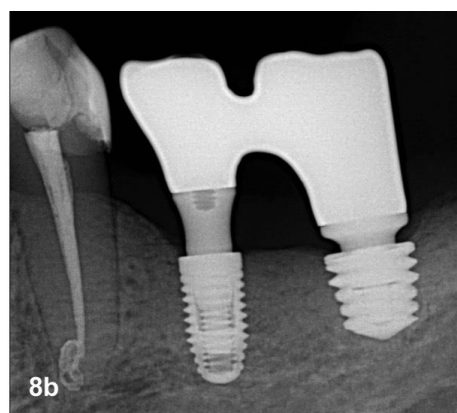
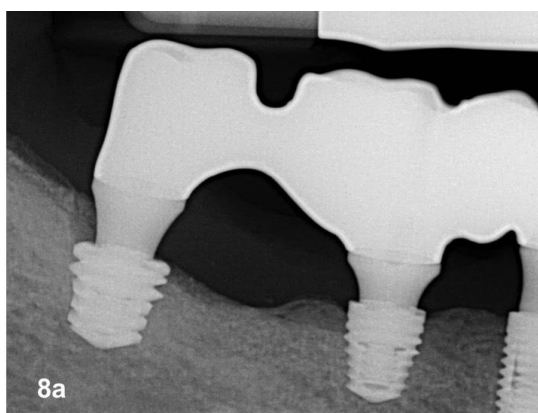
**Figure 6:** (a) Digital scanning for making metal-ceramic prostheses. Scan-bodies in position to determine the exact position of the abutments. (b) Scan with provisionals in position, with the determination of occlusion with the upper arch.



*Figure 6: (b) Scan with provisionals in position, with the determination of occlusion with the upper arch.*



*Figure 7: Infrastructure of permanent CrCo prostheses, made by milling, adapted on the model obtained through 3D printing of the digital scanning file.*



*Figure 8: (a) Verification of the settlement of the infrastructures on the right side through periapical radiography. (b) Verification of the settlement of the infrastructures on the left side through periapical radiography. Note the preservation of peri-implant bone tissue.*

The settlement was verified by periapical radiographs on the left side (Figure 8a) and the right side (Figure 8b) and the parts were sent to the laboratory for the preparation and application of feldspathic ceramics. The definitive prostheses were screwed with 10 N/cm torques on each screw, determined by a Torquemeter ratchet (NEODENT™). Periapical radiographs were taken to analyze the settlement adaptation and Panoramic radiography for final documentation (Figure 9) and finally, the access holes were isolated with Teflon and closed with a temporary light-curing restorative. The follow-up of the patient was carried out for two months, after which the restoration of the access holes in photopolymerizable resin and clinical discharge was performed, with satisfactory functional and aesthetic results (Figure 10a and 10b).



**Figure 9:** Final Panoramic Radiograph, after installation of the prostheses





*Figure 10: (a) Right metal-ceramic prosthesis installed. Final evaluation after two months of installation.*



*Figure 10: (b) Left metal-ceramic prosthesis installed. Final evaluation after two months of installation.*

## **DISCUSSION**

The clinical occurrence of patients seeking rehabilitation in the posterior areas of the jaws due to early tooth loss is a reality present in daily clinical practice. The absence of the tooth in the alveolus triggers a cascade of biological bone remodeling events [2,17,18] and readaptation of specialized soft tissues [19]. In the first three months after extraction, bone remodeling is characterized by a more pronounced structural loss in the buccolingual direction [18]. When related to the posterior region of the lower arch, as in the present report, the presence

of the condition clinical diagnosis of bone loss in height and the predominance of oral mucosa in substitution to the keratinized gingiva is frequent. This condition has considerable influences on dental rehabilitation, especially when it involves planning implants and implant-supported prostheses [20].

The technological evolution of short implants in macro and microstructure seeking greater primary stability, and the growing demand for procedures with fast, predictable resolution and lower morbidity and cost, contribute to this type of implant being a predominant choice compared to reconstructive procedures for rehabilitation in atrophic arches [2,7,8,21,22].

Specific conditions must be respected when choosing to use short implants, with a view to tissue preservation and treatment longevity, such as the observation of bone and soft tissue quality. In this case, the presence of type II bone was observed, with a thin gingival phenotype and a predominance of the alveolar mucosa over the mandibular ridge. The use of surgical burs with high cutting power, the performance of precise surgical technique and the use of implants with large diameters ( $\geq 4$  mm) are also important specific conditions to achieve the mentioned objectives, in addition to considering the systemic conditions of the patient [2,7], which in this case was favorable, without restrictions, with an ASA II classification.

Prostheses on short implants usually result in long teeth, so conditions that promote prosthetic stability should be sought. The occlusal crown table on short implants should preferably be reduced, with maximum harmonic contact points, shallow grooves and low cusps, with an axial distribution of forces. Multiple prostheses are preferably indicated, and they must be joined. In addition, the use of intermediate pillars at least 1.5 mm in height from the transmucosal, when feasible, contributes to the stability of the peri-implant tissue, preventing marginal bone loss, by favoring the restoration of a biological space in the peri-implant gingival

sulcus [2]. The conditions mentioned were applied in the case in question, as the objective of optimizing the biomechanical results.

Still paying attention to the maintenance of bone tissue and peri-implant soft tissues, authors [13,23] emphasize that the presence of keratinized mucosa with a minimum width and thickness of 2 mm around the prostheses favors biological stability against the evolution of inflammatory processes and possible tissue recessions, consequently contributing to aesthetics and better conditions for peri-implant hygiene. Therefore, in view of the unfavorable gingival clinical feature found in this case, the need to change the phenotype was considered. The manipulation of soft tissues, such as FGG and SCTG surgeries are the most frequently indicated for this purpose [24] these being the surgical techniques applied in this case. The determination of the type of soft tissue graft to be used depends on the location and extent of the recipient area and the gingival phenotype.

Subepithelial connective tissue is considered the gold standard for procedures to increase tissue thickness around implants and for aesthetic areas, however, it is limited by the extension of the recipient area, since obtaining extensive bands of connective tissue is often not feasible [25]. In the case presented, the SCTG technique was applied on the left side, as it is less extensive and requires an increase in peri-implant tissue thickness. FGG promotes an increase in the width of the keratinized gingiva band, replacing the alveolar mucosa. This procedure results in a change in the color of the gingiva, which may compromise aesthetics, and is therefore avoided in anterior regions [25,26]. This technique was applied on the right side of the lower arch, where the demand for gingival extension was greater.

Currently, the use of technological resources is emphasized, in order to increase the predictability, dynamics, quality and precision of prostheses on implants [16,27,28]. The digital flow for prosthesis execution involves the use of an intraoral scanner, which depends on a learning curve [28] or a bench scanner, the latter being used for a digital copy of the model

instead of the intraoral digital copy. The images obtained are transferred to planning software, which allows the virtual design of the elements necessary for prosthetic rehabilitation (CAD), reconfiguring form and function with extreme precision. The virtual planning is then carried out in the laboratory (CAM), digitally, through a printer (provisional crowns, guides and models), or a milling machine (structures in feldspar ceramic, zirconia, lithium disilicate or silicate, titanium, chromium/cobalt and resins, depending on the structure to be milled and its purpose). In this case, we opted for the milled infrastructure in CrCo metal, overlapped by feldspathic ceramics, as these materials are highly resistant, durable and result in better adaptation and a smaller marginal gap when compared to the conventional technique [29,30] in addition to requiring less cost compared to the all-ceramic prosthesis.

The CAD-CAM system connects a scanner, software, printer and milling machine for the rehabilitation of the patient in a fast, resistant and precise way, even allowing the personalization of intermediaries. Therefore, it can be said that the digital flow brings advantages to the oral rehabilitation process, allowing the execution of cases with benefits, such as visual and dynamic planning, high level of adaptation of the pieces performed and greater agility of consultations, leading to a superior treatment outcome.

## **CONCLUSION**

The association between the use of short implants, change in the gingival phenotype and digital workflow proved to be favorable procedures in the rehabilitation of the posterior region of the mandible, resulting in increased predictability of the result and satisfaction with the treatment.

## **REFERENCES**

1. Mendes WB, Batista W, Miyashita E, Oliveira, GG de. Reabilitação oral: previsibilidade e longevidade. Nova Odessa: Napoleão; 2011. p. 692-725.

2. Thomé G, Bernardes SR, Sartori IM. Uso de implantes curtos: decisão baseada em evidências científicas. *Notícia e Ciência*. 2007;4(1):2-4.
3. Peñarrocha-Oltra D, Aloy-Prósper A, Cervera-Ballester J, Peñarrocha-Diago M., Canullo L, Peñarrocha-Diago M. Implant treatment in atrophic posterior mandibles: vertical Regeneration with Block Bone Grafts Versus Implants with 5.5-mm Intrabony Length. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. 2014;29(3):659-66.
4. Pistilli R, Felice P, Cannizzaro G, Piatelli M, Corvino V, Barausse C, et al. Posterior atrophic jaws rehabilitated with prostheses supported by 6 mm long 4 mm wide implants or by longer implants in augmented bone. One-year post-loading results from a pilot randomised controlled trial. *European Journal of Oral Implantology*. 2012;5(1): 19-33.
5. Anitua E, Orive G, AguirreJJ, Andía I. Five-Year Clinical Evaluation of Short Dental Implants Placed in Posterior Areas: a retrospective study. *Journal of Periodontology*. 2008;79(1):42-48.
6. Annibali SCMDD, Cristalli MP, Dell'Aquila D, Bignozzi I, La Monaca G, Pilloni A. Short Dental Implants: a systematic review. *Journal of Dental Research*. 2012;91(1):25-32.
7. Jung RE, Al-Nawas B, Araujo M, Avila-Ortiz G, Barter S, Brodala N, et al. Group 1 ITI Consensus report: the influence of implant length and design and medications on clinical and patient reported outcomes. *Clinical Oral Implants Research*. 2018;29(16):69-77.
8. Carosi P, Lorenzi C, Laureti M, Ferrigno N, Arcuri C. Short dental implants ( $\leq 6$  mm) to rehabilitate severe mandibular Atrophy: a systematic review. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. 2021;36:30-7.
9. Longoni S, Tinto M, Pacifico C, Sartori M, Andreano A. Effect of Peri-implant Keratinized Tissue Width on Tissue Health and Stability: systematic review and meta-analysis. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. 2019; 34(6):1307-17.
10. Fiorellini JP, Luan K.W, Chang YC, Kim DM, Sarmiento HL. Peri-implant Mucosal Tissues and Inflammation: Clinical Implications. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. 2009;34:s25-s33.
11. Araújo MG, Lindhe J. Peri-implant health. *Journal of Periodontology*. 2018;89(1):s249-s256.
12. Giannobile WV. On behalf of the Groups of the 2<sup>nd</sup> Osteology Foundation Consensus Meeting. Evidence-based knowledge on the aesthetics and maintenance of peri-implant soft tissues: Osteology Foundation Consensus Report Part 1-Effects of Soft Tissue Augmentation Procedures on the Maintenance of Peri-implant Soft Tissue Health. *Clinical Oral Implants Research*. 2018;29(15):7-10.
13. Wang HL, Zucchelli G. Editorial: significance of peri-implant keratinized mucosa width and soft tissue thickness international. *Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*. 2019;39(6):809-887.

14. FDI World Dental Federation. CAD/CAM Dentistry Adopted by the FDI General Assembly 2017. *International Dental Journal*. 2018;68:18-19.
15. Berutti LB, Batista AUD. Uso de scanners intraorais em implantodontia. *Revista Cubana de estomatologia*. 2020;57(2):e2366.
16. Kayle G. Managing the accelerating advancements of technology in the modern practice. *Dentaleconomics.com Science and Tech*. 2018;8:61.
17. Misch CE. Short dental implants: a literature review and rationale for use. *Dent Today*. 2005;24(8):64-68.
18. Schropp L, Wenzel A., Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiograph 12-Month prospective study. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*. 2003;23(4):313-23.
19. Chappuis V, Araújo MG, Buser D. Clinical relevance of dimensional bone and soft tissue alterations post-extraction in esthetic sites. *Periodontology 2000*. 2017;73(1):73-83.
20. Seibert JS, Salama H. Alveolar ridge preservation and reconstruction. *Periodontology 2000*. 1996;11:69-84.
21. Ravidà A, Wang IC, Barootchi S, Askar H, Tavelli L, Gargallo-Albiol J, Wang HL. Meta-analysis of randomized clinical trials comparing clinical and patient-reported outcomes between extra-short ( $\leq 6$  mm) and longer ( $\geq 10$  mm) implants. *Journal of Clinical Periodontology*. 2019;46(1):118-42.
22. Uehara PN, Matsubara VH, Igai F, Sesma N, Mukai MK, Araujo MG. Short Dental Implants ( $\leq 7$ mm) Versus Longer Implants in Augmented Bone Area: a meta-analysis of randomized controlled trial. *The Open Dentistry Journal*. 2018;12:354-365.
23. Monje A, Blasi G. Significance of keratinized mucosa/gingiva on peri-implant and adjacent periodontal conditions in erratic maintenance compliers. *Journal of Periodontology*. 2019;90(5):445-53.
24. Thoma DS, Buranawat B, Hämmerle CH, Held U, Jung RE. Efficacy of soft tissue augmentation around dental implants and in partially edentulous areas: a systematic re-view. *Journal of Clinical Periodontology*. 2014;41(15):s77-s91.
25. Sculean A., Chappuis V, Cosgarea R. Coverage of mucosal recessions at dental implants. *Periodontology 2000*. 2017;73(1):134-40.
26. Schmitt CM, Moest T, Lutz R, Wehrhan F, Neukam FW, Schlegel KA. Long-term outcomes after vestibuloplasty with a porcine collagen matrix (Mucograft®) versus the free gingival graft: a comparative prospective clinical trial. *Clinical Oral Implants Research*. 2016;27(11):e125-e133.
27. Hämmerle CH, Cordaro L., van Assche N, Benic GI, Bornstein M, Gamper F, et al. Digital technologies to support planning, treatment, and fabrication processes and outcome

assessments in implant dentistry. Summary and consensus statements. The 4th EAO consensus conference 2015. *Clinical Oral Implants Research*. 2015;26(11):97-101.

28. Davidowitz G, Kotick PG. The use of CAD/CAM in dentistry. *Dental Clinics of North America*. 2011;55(3):559-70.

29. Rai R, Kumar SA., Prabhu R, Govindan RT, Tanveer F. Evaluation of marginal and internal gaps of metal ceramic crowns obtained from conventional impressions and casting techniques with those obtained from digital techniques. *Indian Journal of Dental Research*. 2017;28:291-97.

30. Real-Voltas F, Romano-Cardozo E, Figueras-Alvarez O, Brufau-de Barbera M, Cabratosa-Termes J. Comparison of the Marginal Fit of Cobalt-Chromium Metal-Ceramic Crowns Fabricated by CAD/CAM Techniques and Conventional Methods at Three Production Stages. *The International Journal of Prosthodontics*. 2017;30(3) :304-5.