

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA BÁSICA E ORAL

MELISSA APARECIDA BATOKI CHAD

**Avaliação do β -Fosfato Tricálcico e do Biovidro F18 na preservação
do rebordo alveolar pós-exodontia.**

**Ribeirão Preto
2024**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA BÁSICA E ORAL

MELISSA APARECIDA BATOKI CHAD

**Avaliação do β -Fosfato Tricálcico e do Biovidro F18 na preservação
do rebordo alveolar pós-exodontia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.

Área de concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Alan Grupioni Lourenço

Ribeirão Preto
2024

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

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Chad, Melissa Aparecida Batoki

Avaliação do β -Fosfato Tricálcico e do Biovidro F18 na Preservação do Rebordo Alveolar Pós-Exodontia. Ribeirão Preto, 2024.

106 p.: il. ; 30 cm

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Biologia Oral.

Orientador: Lourenço, Alan Grupioni

1. Preservação do rebordo alveolar. 2. β -Fosfato Tricálcico. 3. Biovidro F18.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CHAD, Melissa Aparecida Batoki

Avaliação do β -Fosfato Tricálcico e do Biovidro F18 na preservação do rebordo alveolar pós-exodontia

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.

Aprovada em ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado nos Laboratórios de Biologia Oral e Histopatologia do Departamento de Biologia Oral e no LAB 3D BIO do Departamento de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia.

“Não tenho nenhum talento especial. Apenas sou apaixonadamente curioso.”

Albert Einstein

À Thales, Ivani, José Gebran, José Gebran, e Carlos Alberto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por tudo que fez e faz por mim, por amortecer e aflorar todo o caminho que percorri para com esses estudos, somente Ele sabe o quanto amo a minha profissão. *Merci, pour tout, Dieu.*

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e à Universidade de São Paulo, representadas atualmente pelo Diretor, Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva, e pelo Vice-diretor, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, bem como à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado, que foi um dos meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alan Grupioni Lourenço, pela orientação e diversos ensinamentos durante esses anos. Nossa convivência foi boa e gerou uma amizade e admiração profissional pela competência com que executa os projetos de pesquisa. Aprendi que ser um bom professor é um trabalho árduo: é melhorar o que parece bom; é evoluir a cada dia.

Ao professor Marcelo Azenha, que foi essencial desde o início deste projeto. Este projeto representou um marco em minha carreira profissional, e sua contribuição foi fundamental para isso. Obrigada.

À professora Marina Souza pela disposição constante em me orientar e discutir sobre os vidros bioativos, proporcionando todo o suporte necessário para a realização deste trabalho. Sua orientação foi essencial para o desenvolvimento e a escrita deste estudo.

Ao professor Gileade, que me introduziu ao trabalho com microtomografia, essencial para a análise do meu estudo. Mesmo à distância, ele sempre se mostrou disposto a orientar e auxiliar em todas as ocasiões em que precisei. Sua ajuda foi de grande importância para mim, e sou muito grata por isso.

Aos queridos amigos que fiz nos laboratórios de Biotério, Histologia, e Microtomografia, Adriana, Gilberto e Adriana, agradeço de todo o coração os ensinamentos, a disposição, e as conversas que tivemos, aprender com vocês foi realmente maravilhoso, e mais especial ainda foi a forma como me recebiam e tratavam. Obrigada por me acolherem, tenho

certeza que esse mestrado foi muito além da pesquisa e do título que irei receber, tenho certeza que tenho pessoas especiais em Ribeirão Preto.

À Imaculada, que sempre se mostrou disposta a ajudar todos os alunos e me auxiliou inúmeras vezes durante o curso de Mestrado. Sua ajuda foi valiosa e fez uma grande diferença na minha jornada acadêmica.

Aos colegas do curso de Mestrado em Biologia Oral e Pediatria da FORP-USP, especialmente à Amanda e à Magdalena, com quem tive a oportunidade de estar no laboratório. É inspirador encontrar profissionais que verdadeiramente amam o que fazem, e sou grata por nossos caminhos terem se cruzado.

A minha família, que sempre acreditou em mim, me apoiou e me deixou ir. Vocês são muito mais do que eu poderia merecer e além de tudo que pedi a Deus. Mãe e Thales, amo vocês profundamente.

Obrigada, de todo o coração.

CHAD, MAB. **Avaliação do β -Fosfato Tricálcico e do Biovidro F18 na Preservação do Rebordo Alveolar Pós-Exodontia**. Dissertação (Mestrado). Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. 2024. 106 f.

RESUMO

A redução do rebordo alveolar pós-exodontia pode dificultar a reabilitação oral com implantes dentários. Por essa razão diversos biomateriais aloplásticos vêm sendo desenvolvidos para preservar o volume ósseo alveolar pós-exodontia. Este estudo objetivou avaliar comparativamente dois biomateriais reabsorvíveis de terceira geração quanto sua capacidade de estimular a neoformação óssea em alvéolos de ratos pós-exodontia: o Biovidro F18 e o β -Fosfato Tricálcico. O β -TCF é uma cerâmica granulada sintética reabsorvível com uso consagrado e o F18 é um biovidro, com alto teor de sílica, desenvolvido pela Universidade Federal de São Carlos.

Após a extração dos incisivos superiores direitos de 45 ratos, os alvéolos foram preenchidos com F18, β -TCF, ou deixados sem biomaterial no grupo controle. Após períodos de 7, 14 e 28 dias, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados e suas hemi-maxilas foram analisadas por microtomografia e histomorfometria, visando quantificar a neoformação óssea.

A análise de variância ANOVA de duas vias, revelou que o β -TCF induziu uma neoformação óssea significativamente maior do que o grupo controle, como indicado por diversos parâmetros microtomográficos. O F18, embora não tenha superado o controle em todos os aspectos, mostrou desempenho comparável ao β -TCF.

Concluimos que o β -TCF é eficaz na promoção de neoformação óssea, e o F18, apesar de não exceder o grupo controle, demonstra neoformação óssea comparável ao β -TCF. Este achado é promissor e evidencia o biovidro F18 como uma potencial alternativa como biomaterial para a preservação do rebordo ósseo.

Palavras chaves: Biovidro F18, β -Tricálcio Fosfato, Preservação do Rebordo Alveolar, Preservação alveolar.

Chad, MAB. **Evaluation of β -Tricalcium Phosphate and Bioglass F18 in the Preservation of the Alveolar Ridge after Tooth Extraction** Thesis (Master's Degree). Ribeirão Preto: School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2024. 106 f.

ABSTRACT

The reduction in alveolar ridge volume following tooth extraction can lead to difficulties in oral rehabilitation using dental implants. Consequently, various alloplastic biomaterials have been engineered to preserve the alveolar bone post-extraction. This study aims to evaluate and compare the efficacy of two third-generation resorbable biomaterials—Bioglass F18 and β -Tricalcium Phosphate (β -TCP)—in promoting new bone formation within rat post-extraction sockets. β -TCP, a synthetic granulated ceramic, is well-established in clinical use, while Bioglass F18, a high-silica content bioglass, has been developed by the Federal University of São Carlos.

After extracting the right upper incisors in 45 rats, the sockets were either filled with F18, β -Tricalcium Phosphate (β -TCP), or left unfilled to serve as the control group. To quantify new bone formation, five animals from each group were euthanized at intervals of 7, 14, and 28 days post-extraction. Their hemi-maxillae were subsequently analyzed using microtomography and histomorphometry.

Two-way ANOVA analysis revealed significant differences in bone neoformation, with β -Tricalcium Phosphate (β -TCP) inducing notably higher levels of new bone growth compared to the control group, as evidenced by microtomographic parameters. Although Bioglass F18 did not surpass the control group in terms of new bone formation, its performance was comparable to that of β -TCP.

In conclusion, β -Tricalcium Phosphate (β -TCP) has proven to be effective in promoting new bone formation. Although Bioglass F18 did not surpass the control group in all metrics, its capacity to support new bone growth was comparable to that of β -TCP. This outcome positions F18 Bioglass as a promising potential alternative biomaterial for alveolar ridge preservation.

Keywords: F18 bioglass, β -Tricalcium Phosphate, Alveolar Ridge Preservation; Socket preservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 . Experimentação e cirurgia. A) Protocolo medicamentoso utilizado. B) Animal anestesiado via intraperitoneal. C, D e E) Exodontia dentária do incisivo superior direito, dente após a exodontia, e o alvéolo preparado para a enxertia. F e G) Biomaterial inserido no alvéolo com o auxílio de um porta amálgama infantil. H, I e J) Sutura com fio multifilamentar absorvível e região sutura e sem hemorragia.

Figura 2. Microtomógrafo – 1276, Invivo - Bruker, disponível no laboratório multiusuário Lab 3D BIO do Departamento de Periodontia e Cirurgia Bucomaxilofacial da FORP-USP.

Figura 3 . Imagem ilustrativa dos terços alveolares utilizados como parâmetros para as avaliações microtomográficas e histológicas deste estudo. Figura adaptada da Costa et al. 2023.

Figura 4 . Avaliação da neoformação óssea alveolar no grupo Controle e nos grupos tratados com Biovidro F18 (F18) e beta-tricálcio-fosfato (β -TCF) através dos seguintes parâmetros microtomográficos: volume ósseo (a), porcentagem de volume ósseo (b), superfície óssea (c), espessura trabecular (d), número de trabéculas (e), separação trabecular (f).

Figura 5 . Porcentagem de área de neoformação óssea em relação aos grânulos residuais dos biomateriais β -TCF e F18, apresentados nas imagens área óssea/área óssea total (a), volume ósseo (b), porcentagem de volume ósseo (c), superfície óssea (d).

Figura 6 . Reconstrução 3D pelo programa CTVox, em regeneração óssea do Grupo Controle (A) 7 dias, (B) 14 dias, (C), 28 dias. Grupo F-18 (D) 7 dias, (E) 14 dias, (F) 28 dias. Grupo β -TCF (G) 7 dias, (H) 14 dias, (I) 28 dias.

Figura 7 . Imagens microtomográfica em feixes axiais dos grupos de estudo, Grupo Controle (A) 7 dias, (B) 14 dias, (C), 28 dias. Grupo F-18 (D) 7 dias, (E) 14 dias, (F) 28 dias. Grupo β -TCF (G) 7 dias, (H) 14 dias, (I) 28 dias.

Figura 8 . As imagens acima representam os cortes histológicos dos grupos de estudo com infiltrado inflamatório crônico e tecido de granulação. Controle 7 dias (A), 14 dias (B), 28 dias (C); F18 7 dias (D), 14 dias (E), 28 dias (F); β -TCF 7 dias (H), 14 dias (I), 28 dias (J).

Figura 9 . As imagens acima representam os cortes histológicos dos grupos de estudo, Controle 7 dias (a), 14 dias (b), 28 dias (c); F-18 7 dias (d), 14 dias (e), 28 dias (f); β -TCF 7 dias (g), 14 dias (h), 28 dias (i). Descrição na imagem: O - tecido ósseo, C - tecido conjuntivo, V - vasos sanguíneos, B - biomaterial.

LISTA DE TABELA

Tabela 1 . Dados descritivos (média e desvio padrão) da neoformação óssea alveolar no grupo Controle e nos grupos tratados com Biovidro F18 (F18) e beta-tricálcio-fosfato (β -TCF) através dos seguintes parâmetros microtomográficos: volume ósseo (a), porcentagem de volume ósseo (b), superfície óssea (c), espessura trabecular (d), número de trabéculas (e), separação trabecular (f).

Tabela 2 . Apresenta média e desvio padrão com relação aos grupos e ao tempo de 7 dias da neoformação óssea e resíduos dos biomateriais β -TCF e F18.

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

cm centímetro(s)

mm milímetro(s)

µm micrômetro(s)

Kg Kilograma (s)

mg miligrama (s)

% porcentagem

°C graus cécius

α alfa

UI unidades internacionais

= igual

< menor

β-TCF: β-Fosfato Tricálcico.

F18: Biovidro F18

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
2. OBJETIVOS.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Biomateriais.....	39
3.2 Animais, experimentação e cirurgia.....	39
3.3 Eutanásia dos animais e coleta do material.....	42
3.4 Análise microtomográfica.....	42
3.5 Processamento histológico.....	44
3.6 Análise histomorfométrica.....	44
3.7 Análise estatística.....	45
4. RESULTADOS.....	49
4.1 Análise microtomográfica.....	49
4.2 Análise histológica	57
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS.....	81

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Em 2020, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística constatou que quase 34 milhões de brasileiros, com mais de 18 anos, já perderam mais de 13 dentes (IBGE, 2020). O tratamento protético implanto-suportado é atualmente reconhecido como a abordagem mais eficaz para a reabilitação oral após a perda dentária (Ohba et al., 2019). No entanto, após a exodontia dentária ocorre uma sequência de eventos inflamatórios e adaptativos que culminam com a redução do volume do osso alveolar, o que pode levar a uma largura ou altura insuficiente para a reabilitação com implantes dentários (Mezzomo et al., 2011).

A falta de suporte ósseo alveolar, seja por reabsorção óssea fisiológica, trauma ou patologias na região cirúrgica, muitas vezes requer enxertia óssea para aumentar a área afetada. A enxertia óssea, embora essencial em alguns casos, acarreta desvantagens como aumento do tempo de tratamento, custos mais elevados, e riscos de infecção e morbidades na área doadora. Frente a esses desafios, a utilização de biomateriais sintéticos emerge como uma alternativa promissora aos enxertos autógenos. Esses biomateriais apresentam vantagens como a de não afetar os tecidos saudáveis, menor risco de contaminações virais e bacterianas, podem ser absorvidas pelo organismo, além de estimularem a formação óssea (Oliveira, et al., 2010).

A preservação do volume ósseo alveolar após a exodontia é de grande importância, especialmente considerando que muitas vezes a reabilitação com implantes dentários não pode ser imediatamente realizada (Ohba et al., 2019). Estratégias focadas na preservação do osso alveolar são essenciais e incluem atenção às condições periodontais pré-operatórias, implementação de procedimentos cirúrgicos menos invasivos e a utilização de biomateriais que favorecem a neoformação óssea (Chappuis, Araujo, Buser, 2017; Al Yafi, Alchawaf, Nelson, 2019).

Nas últimas décadas, tem ocorrido uma grande evolução no desenvolvimento de biomateriais, possibilitando sua aplicação na substituição, regeneração e cicatrização dos tecidos do corpo humano. Esta inovação tem um impacto significativo na restauração da forma e função de tecidos danificados, seja devido a processos patológicos ou traumas, contribuindo assim para uma melhora substancial na qualidade de vida. A biocompatibilidade notável desses biomateriais os torna objeto de intensa pesquisa, com especial destaque para suas propriedades osteocondutivas e osteoindutivas (Hench, Thompson, 2010).

Ao analisar a trajetória dos biomateriais, identificamos três gerações distintas. A primeira geração, desenvolvida nas décadas de 1960 e 1970, consistia em dispositivos feitos de biomateriais, denominados próteses, destinados a serem utilizados no interior do corpo humano.

Seu principal objetivo era alcançar a combinação adequada de propriedades físicas para se integrar aos tecidos substituídos, minimizando a toxicidade no hospedeiro. Caracterizados pela inércia, esses biomateriais eram predominantemente monofásicos e muitos eram adaptações de materiais já existentes, porém com elevados níveis de pureza para evitar a liberação de toxinas e corrosão no organismo.

A segunda geração de biomateriais, que surgiu em meados da década de 1980, é caracterizada por sua natureza bioativa, capaz de induzir ações e reações controladas no ambiente fisiológico onde são inseridos (Holzapfel et al., 2013). Durante este período, esses materiais bioativos foram incorporados em várias áreas da medicina e odontologia. Isso incluiu a experimentação com diversas composições de vidros bioativos, cerâmicas, vitrocerâmicas e compósitos em ensaios clínicos. Paralelamente, desenvolveu-se a abordagem dos biomateriais reabsorvíveis, visando uma interação mais dinâmica com os tecidos. Essa abordagem buscava uma decomposição química controlada, permitindo a reabsorção dos materiais e sua eventual substituição por tecido regenerado. Tal processo era visto como uma solução promissora para os desafios encontrados na interface entre biomaterial e tecido ósseo. Contudo, os biomateriais desta geração ainda enfrentavam limitações, pois não replicavam as mudanças nas cargas fisiológicas ou bioquímicas de maneira equivalente aos tecidos vivos (Holzapfel., et al, 2013).

Os biomateriais de terceira geração surgiram na primeira década do século XXI, projetados para estimular respostas celulares específicas ao nível da biologia molecular. Essa geração ofereceu à medicina regenerativa o controle genético do processo de reparo tecidual, resultando em tecidos reparados que se assemelham estruturalmente aos tecidos naturais e são adaptados ao ambiente fisiológico (Hench, Thompson, 2010).

Os biomateriais são classificados em quatro categorias principais: autógenos (originados do próprio osso do paciente), alógenos (enxertos provenientes de banco de ossos), xenógenos (enxertos de origem variada, sendo o osso bovino o mais comum), e aloplásticos (materiais sintéticos ou inorgânicos utilizados como substitutos para enxertos ósseos) (Nampo et al., 2010). Cada uma dessas categorias tem demonstrado eficácia na redução da reabsorção óssea alveolar após a extração dentária, e a literatura não apresenta evidências de superioridade de um material sobre o outro (Horváth et al., 2013). No entanto, é importante observar que alguns enxertos, como os xenógenos e aloplásticos, podem ser reabsorvidos mais lentamente, apresentando partículas remanescentes após sete meses ou mais tempo após a enxertia (Al Yafi, Alchawaf, Nelson, 2019).

Os substitutos ósseos têm sido amplamente empregados para solucionar as limitações decorrentes de grandes perdas de estruturas ósseas ou em situações de tecidos ósseos de baixa

qualidade (Henkel et al., 2006). Esses biomateriais devem atender a critérios específicos, sendo considerados:

- Osseointegráveis: Capazes de estabelecer uma união química à superfície do leito ósseo receptor, sem a formação de tecido fibroso.
- Osteocondutivos: Proporcionam suporte para o crescimento ósseo em sua superfície.
- Osteoindutivos: Estimulam a diferenciação de células mesenquimais pluripotentes do leito receptor em células osteoblásticas.
- Osteogênicos: Possuem a capacidade de promover a neoformação óssea através das células osteoblásticas presentes no biomaterial (Rodrigues, 2022).

Os enxertos de materiais artificiais devem atender a critérios específicos para garantir sua eficácia. Eles devem ser biocompatíveis, assegurando que não causem reações adversas no organismo, além de serem não tóxicos. Esses biomateriais precisam ser ativos e passíveis de remodelação, promovendo assim a neoformação de tecido ósseo (Mezzomo et al., 2011). Do ponto de vista mecânico, é crucial que esses materiais apresentem resistência e elasticidade semelhantes ao leito receptor ou ao tecido ósseo. Além disso, devem ser de fácil aplicação, adaptação e estar disponíveis em quantidade adequada e a qualquer momento. Diante desses requisitos, um extenso conjunto de pesquisas tem sido conduzido com o objetivo de desenvolver biomateriais que possuam características semelhantes ao osso humano, proporcionando assim sua aplicação eficaz em diversas situações clínicas (Azenha et al., 2015). Essa abordagem visa não apenas atender às necessidades biomecânicas, mas também garantir a biocompatibilidade e a capacidade de integração dos biomateriais ao ambiente biológico.

Dada a necessidade de os biomateriais apresentarem características que favoreçam a reparação óssea com semelhanças ao osso humano, eles são classificados com base na resposta tecidual da seguinte forma, segundo Oliveira et al., 2010:

- Biologicamente não ativos: Exemplos incluem a zircônia, como os implantes de zircônia. Esses biomateriais tendem a ter uma resposta tecidual mínima ou nula.
- Biologicamente ativos: Alguns exemplos são os vidros bioativos (F18), o fosfato de cálcio (β -TCF) e a hidroxiapatita. Esses biomateriais demonstram interação e resposta favoráveis com o tecido ósseo, promovendo a bioatividade e a integração eficaz.
- Reabsorvíveis: Incluem vidros, um exemplo são as fibras de vidros bioativos (F18), bem como alguns polímeros como poli (ácido L-lático) (PLLA) e ácido poliglicólico (PGA). Esses biomateriais têm a capacidade de serem gradualmente

reabsorvidos pelo organismo, permitindo a substituição por tecido ósseo natural ao longo do tempo (Navarro et al., 2008. Oliveira et al., 2010. Souza et al., 2017).

Os avanços no campo cirúrgico e tecidual foram impulsionados por casos clínicos que demandavam tipos específicos de biomateriais. Nesse contexto, a criação de biomateriais projetados para estimular as células do organismo e facilitar a regeneração tecidual, com o potencial de reabsorção de seus grânulos, representa um novo paradigma dentro do estudo dos biomateriais (Holzapfel et al., 2013). Essa abordagem inovadora visa não apenas suprir as necessidades estruturais, mas também promover uma resposta biológica favorável que conduza à regeneração eficaz dos tecidos afetados.

Em nosso estudo, os biomateriais da terceira geração e biologicamente ativos a serem investigados são o β -Fosfato Tricálcico de fase pura ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e o Biovidro F18 ($\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-K}_2\text{O-MgO-CaO-P}_2\text{O}_5$) (Passos et al., 2021; Souza et al., 2017). O β -Fosfato Tricálcico (β -TCF) é uma cerâmica granulada sintética reabsorvível, composta por Hidróxido de Cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), Ácido Fosfórico (H_3PO_4) e Sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$). O Biovidro F18, por sua vez, é um biomaterial absorvível que vem sendo desenvolvido desde 2001 pela Equipe do Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, e tem sido testado em diversas situações clínicas tanto na odontologia quanto na medicina (Souza et al., 2017; Azenha et al., 2019).

A crescente demanda por cerâmicas de vidro nas áreas médicas e odontológicas, visando promover o reparo ósseo e tecidual e substituir o tecido mineralizado, tem impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento desses biomateriais. Essa tendência reflete a busca por substitutos artificiais para enxertos ósseos utilizados em diversas regiões e quantidades, com a preocupação de reduzir o risco de infecções virais e bacterianas (Yuan et al., 2002; Roriz et al., 2010; Titsinides et al., 2020).

O β -Fosfato Tricálcico é amplamente reconhecido e utilizado na área médica e odontológica devido à sua capacidade de auxiliar na regeneração óssea e no preenchimento de defeitos. Estudos anteriores, como o realizado por Gupta et al. (2010), observaram a formação óssea de qualidade e semelhante ao enxerto de osso autógeno na região lombar de coelhos com a utilização do β -Fosfato Tricálcico. Em 2019, um estudo conduzido em dois centros europeus de referência avaliou a formação óssea em defeitos maxilares usando o β -TCF em pacientes com fissuras lábio palatinas. Os resultados demonstraram uma melhora significativa na quantidade e qualidade do tecido neoformado, sem complicações ou intercorrências, destacando a confiabilidade desse biomaterial como substituto ósseo (Janssen et al., 2019).

Hench et al. desempenharam um papel crucial no desenvolvimento de biomateriais, criando formulações vítreas cuja composição química se assemelha à do tecido ósseo. Essas formulações vítreas, conhecidas como vidros bioativos ou biovidros, têm a capacidade notável de se ligar aos tecidos vivos, especialmente ao tecido ósseo. O Biovidro mais destacado nesse contexto é o Bioglass®45S5, com uma composição de 45% SiO₂, 24,5% CaO, 24,5% Na₂O e 6% P₂O₅. Por algum tempo, foi considerado o biovidro com os melhores resultados em interação com o tecido ósseo, sendo o primeiro material osteocondutivo a formar uma união firme com o osso quando implantado (Hench et al., 2006).

O vidro bioativo possui uma taxa diferenciada de união ao tecido ósseo, e a formulação F18 se destaca por apresentar uma quantidade significativamente maior de sílica em comparação à formulação tradicional, com 53 a 54% em peso, respectivamente, enquanto o Bioglass 45S5 possui aproximadamente 45% em peso. Esse aumento de sílica é considerado um ganho significativo em termos de estabilidade vítrea, superando o fenômeno de cristalização (Souza et al., 2017).

Os materiais vítreos, especialmente os biovidros, estão no centro de diversas pesquisas atualmente devido à sua capacidade de atrair células responsáveis pela neoformação óssea, além de apresentarem propriedades de osteocondução e osteoindução. Estudos *in vitro* têm demonstrado resultados promissores, com o biomaterial estimulando o crescimento, aumentando a maturação e promovendo a expressão do fenótipo osteoblástico (Souza et al., 2017).

Os Biovidros são amplamente utilizados em cirurgias de cabeça e pescoço, reconstruções de fraturas, cirurgias de levantamento de seio maxilar, preenchimentos dos seios da face e enxertos periodontais. Devido ao seu potencial osteocondutivo e efeito osteoindutor, suas diversas aplicações exigem diferentes formas do biomaterial, como sólidos, pastosos, granulares em vários tamanhos e associações com osso autógeno (Gabbai-Armelin et al., 2017).

Inicialmente, os biovidros, que são biomateriais aloplásticos, enfrentaram resistência devido às suas características frágeis, levando a casos de quebras ou fraturas acidentais durante o uso, resultando na formação de partículas com potencial migratório e risco de danificar tecidos e vasos sanguíneos na região. No entanto, esses biomateriais apresentavam atributos positivos e altamente benéficos para a neoformação óssea, incluindo propriedades osteocondutivas e efeito osteoindutor. Essas características positivas tornaram os biovidros aplicáveis em uma considerável variedade de aplicações clínicas na medicina e odontologia desde a década de 1980 (Hench, 2006).

O objetivo deste projeto de pesquisa é avaliar a capacidade do β -TCF e do Biovidro F18 de promoverem a neoformação óssea comparativamente aos alvéolos dentários não preenchidos por biomateriais em ratos submetidos à exodontia unilateral de incisivos, utilizando análises microtomográficas e histomorfométricas. A hipótese nula deste estudo é que os parâmetros de reparo ósseo serão semelhantes entre os alvéolos preenchidos com β -TCF e F18 comparativamente aos alvéolos preenchidos com coágulo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o processo de reparação de alveolos de ratos preenchidos com os biomateriais: Biovidro F18 e com β -TCF, comparativamente ao alvéolo preenchido com coágulo, através de análises microtomográficas e histomorfométricas.

2.2 Objetivos específicos:

Avaliar comparativamente os seguintes parâmetros referentes ao reparo ósseo pós-exodontia de incisivo central superior direito em alvéolo de ratos preenchidos com Biovidro F18, β -TCF ou coágulo, durante o período de 7, 14 e 28 dias:

- Por análise microtomográfica: 1. Volume de tecido ósseo, 2. Porcentagem do volume tecido ósseo em relação ao osso pré-existente; 3. Superfície óssea; 4. Espessura trabecular; 5. Número de trabéculas; 6. Separação trabecular.
- Por meio de análise histológica: a fração de volume do osso neoformado, presença de inflamação e possíveis reações adversas decorrentes do uso dos biomateriais.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho foi conduzido no Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FORP) da Universidade de São Paulo (Protocolo 2020.1.250.58.0) (ANEXO A).

3.1 Biomateriais

O Biovidro F18 pertence ao sistema $\text{SiO}_2\text{--Na}_2\text{O--K}_2\text{O--MgO--CaO--P}_2\text{O}_5$ e seu processo de fabricação está detalhadamente descrito em Siqueira et al. 2011. Este biomaterial foi fornecido pelo Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos (LaMaV, UFSCAR, São Carlos, SP, Brasil), na granulação de 0,1 a 0,2 mm.

Resumidamente, para a preparação do Biovidro F18, inicialmente ocorre a mistura dos componentes, seguida da fusão. O material fundido é então vertido em moldes de grafite, formando cilindros. Estes são posteriormente triturados para gerar o material particulado. O biovidro é armazenado em recipientes de vidro, selados hermeticamente; e, previamente aos experimentos o Biovidro F18 foi esterilizado por radiação gama.

O β -TCF de fase pura é uma cerâmica granulada sintética reabsorvível, composta por Hidróxido de Cálcio (Ca(OH)_2), Ácido Fosfórico (H_3PO_4) e Sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$). Devido à sua composição, que se assemelha à da matriz óssea, o β -TCF é frequentemente usado em aplicações de substituição ou modificação do tecido ósseo. Este biomaterial é conhecido por favorecer a neoformação óssea através do processo de osteocondução. Assim como o F18, a esterelização do β -TCF é realizado por radiação gama (Titsinides et al., 2020). Para o presente estudo utilizamos o β -TCF (Bioinnovation biomedical, Bauru-São Paulo, Brasil) que foi comercialmente obtido em sua granulação entre 0,1 a 0,5 mm.

3.2 Animais, experimentação e cirurgia

Foram utilizados 45 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade *Hannover*, pesando entre 250 e 300 gramas. Os animais foram alimentados com ração balanceada 6042 Nuvilab CR-1 contendo 1.4% de cálcio e 0.8% de fósforo (Nuvotal, Colombo-Paraná, Brasil) composta de farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral, aminoácidos e aditivo antioxidante.

Água e ração foram disponibilizada *ad libitum*. Os ratos foram acomodados em caixas plásticas de 40x32x17cm, com um máximo de 4 animais por caixa, sob condições controladas de iluminação (ciclo de 12 horas luz/12 horas escuro) e temperatura (entre 21°C e 25°C).

Os 45 ratos foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos, detalhados abaixo, e posteriormente foram submetidos à extração dos incisivos centrais superiores direito:

*Grupo controle: Após a exodontia, os alvéolos de 15 ratos não foram preenchidos com biomateriais, permitindo assim que o processo natural de cicatrização ocorresse, com os alvéolos sendo preenchidos apenas pelo coágulo sanguíneo.

*Grupo F18: os alvéolos de 15 ratos foram preenchidos com vidro bioativo F18.

*Grupo β -TCF: os alvéolos de 15 ratos foram preenchidos com β -Fosfato Tricálcico.

Além disso, em cada grupo, 5 animais foram selecionados para eutanásia em três momentos distintos: aos 7, 14 e 28 dias após a cirurgia. Este cronograma foi estabelecido para avaliar a evolução pós-cirúrgica em diferentes intervalos de tempo.

O cálculo amostral foi realizado no software G Power, considerando um tamanho de efeito de 0,2; nível de significância de 5% e poder de 80%. Considerando que os grupos compreendem três diferentes tempos de estudo, totalizando 15 animais por grupo de estudo (Damy et al., 2010).

Para os procedimentos de extração dos incisivos centrais e implantação dos biomateriais o seguinte protocolo de medicação foi utilizado (Garcia, 2016): os animais foram anestesiados utilizando Ketamina 80mg/kg (Ceva, São Paulo, SP, Brazil) + Xilazina 5 mg/kg (Syntec, Barueri, SP, Brazil) administrado por via intraperitoneal. O tempo de duração destes anestésicos foi de 30 a 45 minutos, tempo suficiente para os procedimentos cirúrgicos propostos (Figura 1).

Todos os animais receberam dose única de 24.000 UI/Kg por via intra- muscular de Pentabiótico Veterinário (Wyeth – São Bernardo do Campo, SP, Brasil) ao final dos procedimentos e medicação analgésica Ketoprofeno 5mg/Kg (Ceva, São Paulo, SP, Brazil) por via subcutânea, este administrado imediatamente ao final dos procedimentos e 24 horas após a dose inicial (Figura 1a, b).

Com o animal anestesiado e em decúbito ventral realizamos a sindesmotomia do incisivo superior direito e o dente foi extraído com fórceps adaptado (Figura 1c, d, e). Imediatamente após a exodontia, os alvéolos foram tratados de acordo com os grupos citados acima, sendo os biomateriais inseridos nos alvéolos com o auxílio de um porta amálgama infantil, certificando-se que o biomaterial preencheu toda a cavidade do alvéolo (Figura 1f). Posteriormente, os alvéolos foram suturados com fio multifilamentar absorvível (Vycril 4.0,

Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com o objetivo de manter o material e o coágulo confinados à cavidade (Figura 1g, h e i).

Figura 1 . Experimentação e cirurgia. A) Protocolo medicamentoso utilizado. B) Animal anestesiado via intraperitoneal. C, D e E) Exodontia dentária do incisivo superior direito, dente após a exodontia, e o alvéolo preparado para a enxertia. F) Biomaterial inserido no alvéolo com o auxílio de um porta amálgama infantil. G, H, I) Sutura com fio multifilamentar absorvível e região sutura e sem hemorragia.



3.3 Eutanásia dos animais e coleta do material

Completados os períodos de 7, 14 e 28 dias, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados em cada um dos períodos através da sobredosagem de Ketamina 300mg/kg + Xilazina 30mg/kg administrados por via intraperitoneal, com as mandíbulas sendo separadas das maxilas com o auxílio de uma lâmina de bisturi.

A maxila foi então separada ao meio através de uma incisão ao nível do plano sagital mediano acompanhando a sutura intermaxilar. Através de um corte com tesoura reta tangenciando a face distal dos molares foi obtida a maxila direita contendo a peça de interesse que consistiu no alvéolo do incisivo central direito. As maxilas dos animais foram fixadas em solução de paraformaldeído tamponado a 4%, por tempo mínimo de 48 horas.

3.4 Análise microtomográfica

As regiões de interesse foram avaliadas em microtomógrafo – 1276 (Invivo - Bruker) (Figura 2), disponível no laboratório multiusuário Lab 3D BIO do Departamento de Periodontia e Cirurgia Bucomaxilofacial da FORP-USP.

As imagens foram obtidas com o aparelho com fonte de raio-X de 100kv e detectados por câmera de 11 megapixel com resolução de até 1µm. A comparação e análise das imagens foram avaliadas nos terços apical, médio e cervical (Figura 3). Cada terço foi dividido em 250 slices, a partir do início do aparecimento da imagem do alvéolo. Para essa avaliação utilizou-se o software Data-viewer CTan, onde foram realizados cinco desenhos interpolados de cada terço (apical, médio e cervical), e fixados os seguintes parâmetros: 70 a 110 são referentes as análises para neoformação óssea, e 110 a 255 serão análises referentes aos biomateriais ou a presença de osso nativo. As análises da formação óssea foram realizadas por um único pesquisador que não teve o conhecimento prévio de qual biomaterial estava avaliando e de qual grupo pertencia à análise.

Após as reconstruções foram analisadas os três terços dos alvéolos dos animais do estudo, seguindo os seguintes parâmetros: 1. Volume do tecido ósseo (mm³); 2. Porcentagem

do volume do tecido ósseo neoformado em relação à volume total do alvéolo dentário (volume ósseo/volume total); 3. Superfície óssea (mm²); 4. Espessura trabecular (mm) 5. Número de trabéculas (1/mm) ; 6 Separação trabecular (mm) de acordo com Freitas et al., 2019 e Bouxsein et al., 2012.

Figura 2. Microtomógrafo – 1276, Invivo - Bruker, disponível no laboratório multiusuário Lab 3D BIO do Departamento de Periodontia e Cirurgia Bucomaxilofacial da FORP-USP.

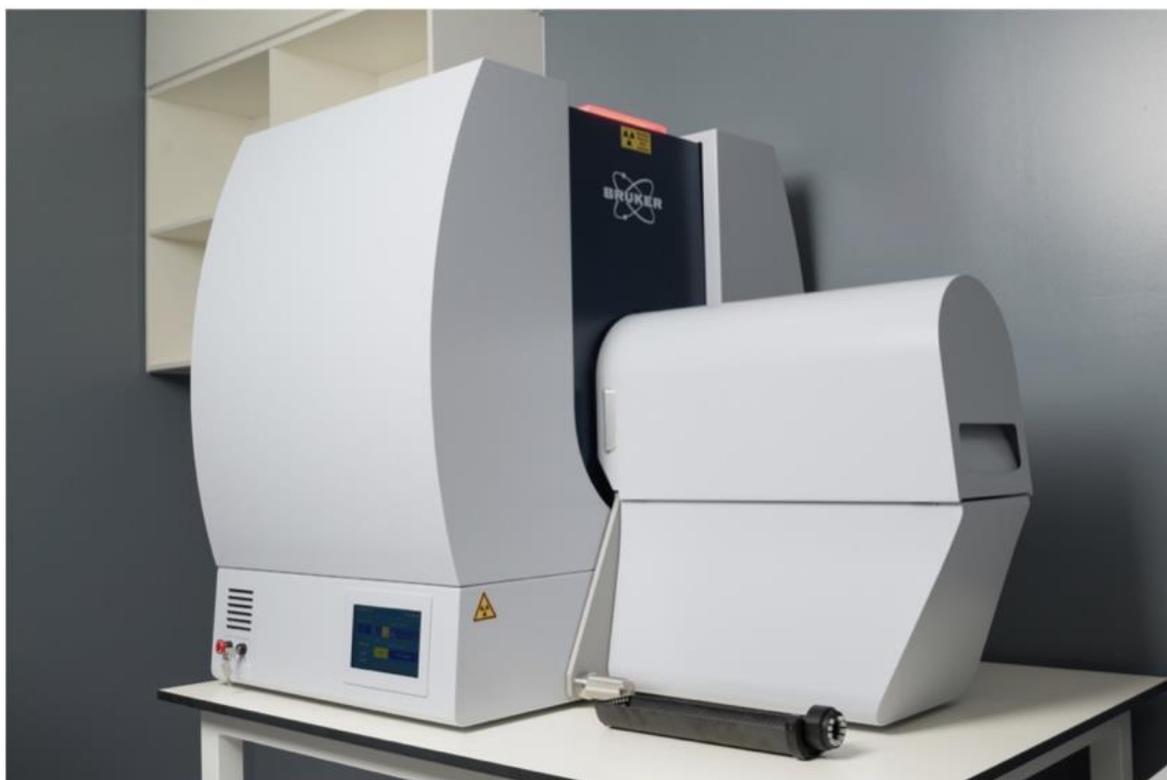
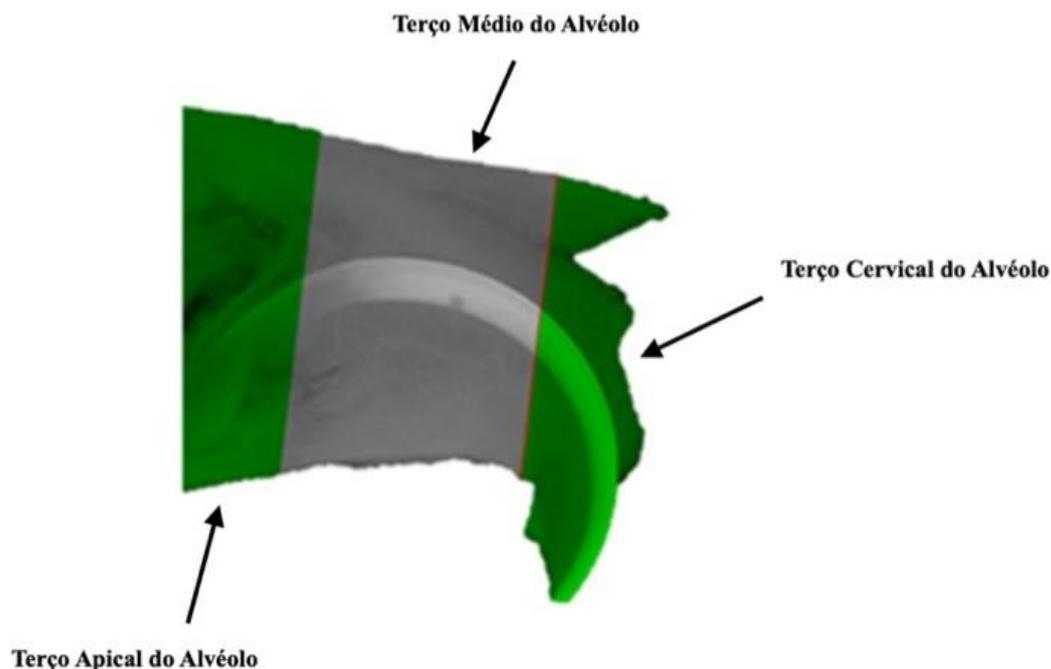


Figura 3 . Imagem ilustrativa dos terços alveolares utilizados como parâmetros para as avaliações microtomográficas e histológicas deste estudo. Figura adaptada da Costa et al. 2023.



3.5 Processamento histológico

As hemi-maxilas direitas imersas paraformaldeído tamponado a 4%, foram descalcificadas por quatro dias em solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 35%. Após esse período foram lavadas por 24 horas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina de forma a permitir cortes longitudinais de seis micrômetros de espessura, que foram corados pela hematoxilina-eosina.

Foram obtidos 10 cortes consecutivos com intervalos de 60 μ m. Um examinador sem conhecimento prévio dos grupos de estudo conduziu a avaliação do reparo ósseo por análise histomorfométrica.

3.6 Análise histomorfométrica

Assim como no exame microtomográfico, o alvéolo foi dividido em três terços: apical, médio e cervical. Foi utilizado para análise quantitativa dos tecidos um microscópio Leica DM LB2 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar Germany) com uma câmera digital de vídeo Leica DFC 280 (Leica Microsystems Imaging AG, Cambridge, England) do Laboratório de

Microscopia do Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal da FORP-USP.

As imagens foram processadas pelo programa Leica Win (Leica Imaging Systems Ltd, Cambridge, England) obtendo-se a fração de volume do osso trabecular, de tecido conjuntivo e de coágulo, em porcentagem, no interior do alvéolo. Os cortes histológicos foram focalizados ao microscópio com objetiva de 20X e 40X e em cada alvéolo foram analisados 15 campos microscópicos (5 em cada terço).

3.7 Análise estatística

As análises dos resultados foram realizadas com o auxílio do software JAMOVI, versão 1.6.23, e as representações gráficas foram geradas utilizando-se o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Boston, MA, USA). Todas as análises estatísticas foram realizadas considerando testes bicaudais e nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$).

As análises descritivas incluíram estimadores pontuais como medianas e quartis (primeiro quartil – Q1 e terceiro quartil – Q3), assim como média e desvio padrão, quando necessário. Para verificar a normalidade de distribuição dos dados foi utilizado teste de Shapiro-Wilk.

Para as comparações entre as variáveis contínuas estimadoras do reparo ósseo ao longo do tempo de estudo foi utilizada a ANOVA de duas vias (tempo e grupo de estudo) seguidas do pós-teste de Tukey.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Análise microtomográfica

A análise de variância de duas vias revelou que o tempo pós-extração dentária impactou todos os parâmetros microtomográficos avaliados, incluindo o volume ósseo ($p < 0,001$), volume ósseo/volume total ($p < 0,001$), superfície óssea ($p < 0,001$), espessura trabecular ($p = 0,012$), número de trabéculas ($p < 0,001$), e separação de trabéculas ($p < 0,001$). De maneira geral a neoformação óssea foi maior após o tempo de 28 dias pós-exodontia, seguido do tempo de 14 e 7 dias. No entanto, para os parâmetros volume ósseo, superfície óssea, espessura trabecular o tempo de 14 e 28 dias pós-extração apresentaram resultados similares, como detalhadamente observado na Figura 4 e Tabela 1. O efeito do tempo em cada um dos diferentes grupos do estudo podem ser detalhadamente observados na Figura 4 e Tabela 1.

Quando comparamos o efeito dos diferentes biomateriais, verificamos que o β -TCF demonstrou maior promoção da neoformação óssea em comparação ao grupo Controle. Especificamente, o β -TCF exibiu aumento significativo na neoformação óssea em comparação ao grupo controle, evidenciado pelos parâmetros microtomográficos: aumento de volume ósseo ($p = 0,016$), elevação percentual do volume ósseo ($p = 0,033$), superfície óssea ($p = 0,027$), e espessura trabecular ($p < 0,001$) e redução na separação trabecular ($p = 0,012$). Ainda em relação ao grupo controle, o F18 apresentou maiores níveis de espessura trabecular ($p = 0,005$) e menor separação entre trabéculas ($p = 0,01$). Embora os demais parâmetros entre o F18 e o grupo controle foram similares, os resultados para o F18 foram comparáveis aos observados para o β -TCF, conforme evidenciado pelos parâmetros microtomográficos, incluindo volume ósseo ($p = 0,82$), porcentual de volume ósseo ($p = 0,066$), superfície óssea ($p = 0,435$), espessura trabecular ($p = 0,204$) e separação trabecular ($p = 0,995$).

Ao analisar a interação entre o período pós-cirúrgico e a utilização de diferentes biomateriais, verificamos que a aplicação dos biomateriais β -TCF e F18 nos alvéolos dos animais resultou em um aumento significativo da neoformação óssea nos estágios iniciais de reparação, particularmente observado no 7º dia após a exodontia. Após este período, a neoformação óssea promovidas pelos biomateriais, β -TCF e F18, mostrou-se semelhante ao

grupo Controle, com a exceção do parâmetro relacionado ao número de trabéculas. Todos os resultados dos parâmetros microtomográficos de neoformação óssea estão detalhadamente descritos na Figura 4 e Tabela 1.

Aos 7 dias após a extração dentária, o β -TCF promoveu maior neoformação óssea do que o grupo Controle, evidenciados pelo aumento dos seguintes parâmetros microtomográficos: volume ósseo ($p=0,049$), porcentagem de volume ósseo ($p<0,001$) e espessura trabecular ($p=0,001$). Embora a neoformação óssea promovida pelo F18 não seja estatisticamente maior do que o grupo Controle, também não verificamos que sua promoção de neoformação óssea seja diferente daquela promovida pelo β -TCF, nos seguintes parâmetros: volume ósseo ($p=0,0995$), porcentual de volume ósseo ($p=0,109$), superfície óssea ($p=0,067$), espessura trabecular ($p=0,107$), número de trabéculas ($p=1,00$) e separação trabecular ($p=1,00$)).

Aos 14 dias após a extração dentária o β -TCF e o F18 apresentaram níveis de neoformação óssea semelhantes ao grupo Controle, exceto para o parâmetro microtomográfico de separação trabecular, onde o grupo F18 apresentou menor separação entre as trabéculas do que o grupo Controle ($p=0,024$).

Aos 28 dias após a extração, todos os parâmetros microtomográficos foram similares entre os diferentes grupos desse estudo.

Figura 4 . Avaliação da neoformação óssea alveolar no grupo Controle e nos grupos tratados com Biovidro F18 (F18) e beta-tricálcio-fosfato (β -TCF) através dos seguintes parâmetros microtomográficos: volume ósseo (A), porcentagem de volume ósseo (B), superfície óssea (C), espessura trabecular (D), número de trabéculas (E), separação trabecular (F).

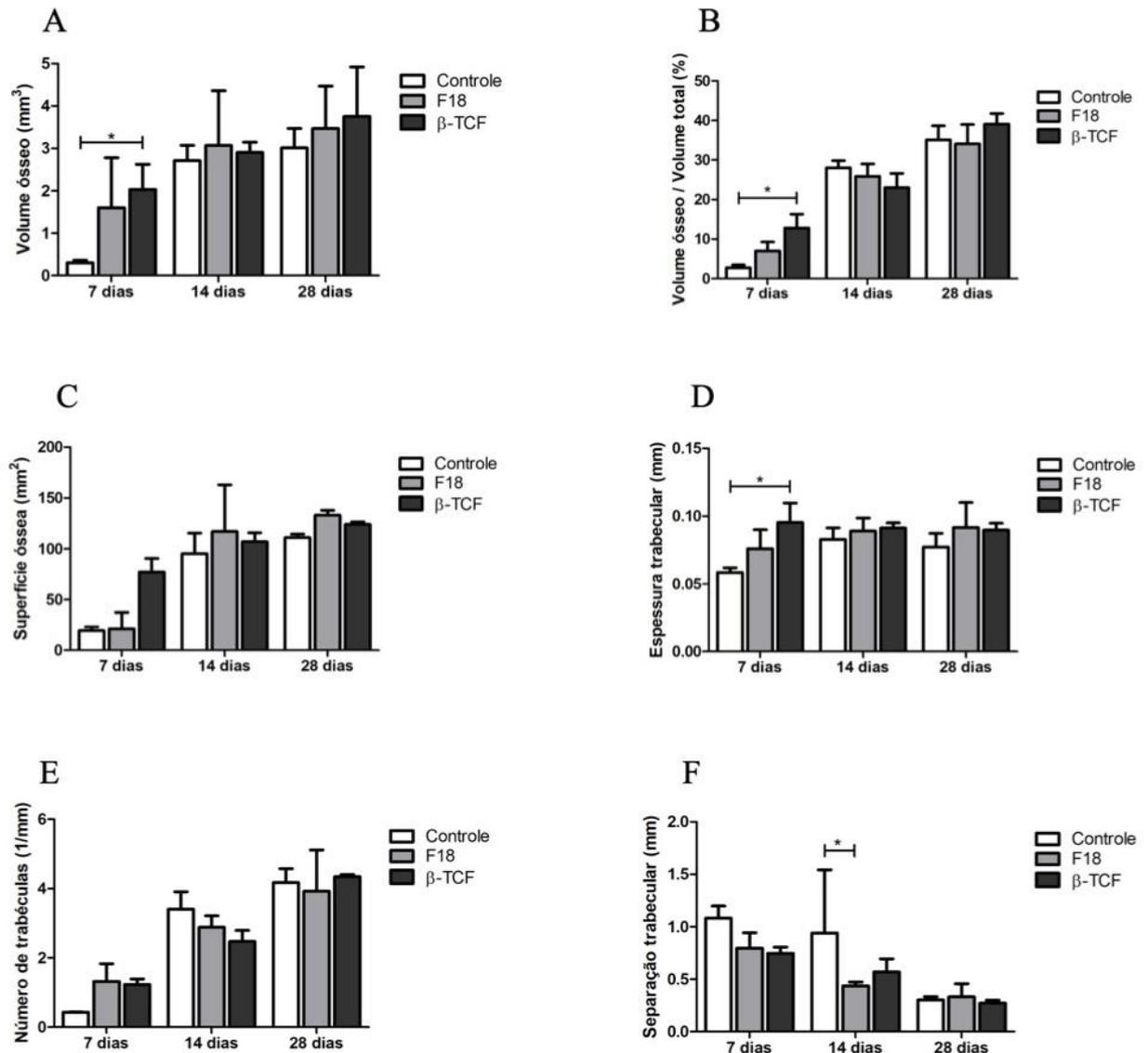


Tabela 1 . Dados descritivos (média e desvio padrão) da neoformação óssea alveolar no grupo Controle e nos grupos tratados com Biovidro F18 (F18) e beta-tricálcio-fosfato (β -TCF) através dos seguintes parâmetros microtomográficos: volume ósseo, porcentagem de volume ósseo, superfície óssea, espessura trabecular, número de trabéculas, separação trabecular, volume ósseo (%) (2) residual.

	Parâmetros Microtomográficos			p valor (post-hoc)		
	7 dias	14 dias	28 dias	7 vs 14 dias	7 vs 28 dias	14 vs 28 dias
Volume Ósseo (mm³)						
Controle	0,300 (\pm 0,0595)	2,71 (\pm 0,363)	3,01 (\pm 0,459)	0,001	<0,001	1
Biovidro F18	1,60 (\pm 1,18)	3,07 (\pm 1,29)	3,47 (\pm 1,0)	0,146	0,025	0,997
β TCF	2,03 (\pm 0,599)	2,9 (\pm 0,246)	3,75 (\pm 1,17)	0,762	0,052	0,793
Controle Vs F18	0,279	0,999	0,992			
Controle Vs β -TCF	0,049	1	0,885			
F18 Vs β -TCF	0,995	1	1			
Volume Ósseo (%)						
Controle	2,74 (\pm 0,717)	28,0 (\pm 1,86)	35,1 (\pm 3,54)	<0,001	<0,001	0,023
Biovidro F18	6,99 (\pm 2,27)	25,9 (\pm 3,11)	34,1 (\pm 4,89)	<0,001	<0,001	0,005
β TCF	12,8 (\pm 3,51)	23 (\pm 3,6)	39,1 (\pm 2,65)	<0,001	<0,001	<0,001
Controle Vs F18	0,456	0,975	1			
Controle Vs β -TCF	<0,001	0,248	0,564			
F18 Vs β -TCF	0,109	0,863	0,255			
Superfície Óssea (mm²)						
Controle	19,2 (\pm 3,91)	95,3 (\pm 20,3)	111 (\pm 10,6)	0,004	<0,001	0,994
Biovidro F18	21,1 (\pm 16,3)	117 (\pm 45,9)	133 (\pm 52,3)	<0,001	<0,001	0,991
β TCF	77,4 (\pm 13,2)	107 (\pm 8,92)	124 (\pm 34,5)	0,761	0,21	0,987
Controle Vs F18	1	0,951	0,942			
Controle Vs β -TCF	0,052	0,994	0,997			
F18 Vs β -TCF	0,067	1	1			
Espessura Trabecular (mm)						
Controle	0,0586 (\pm 0,00352)	0,0829 (\pm 0,00851)	0,0773 (\pm 0,0101)	0,018	0,133	0,994
Biovidro F18	0,0760 (\pm 0,0140)	0,0890 (\pm 0,00009)	0,0917 (\pm 0,0184)	0,563	0,317	1
β TCF	0,0954 (\pm 0,0143)	0,0913 (\pm 0,00375)	0,0898 (\pm 0,00501)	0,999	0,994	1
Controle Vs F18	0,198	0,989	0,43			
Controle Vs β -TCF	<0,001	0,932	0,616			
F18 Vs β -TCF	0,107	1	1			
Número de Trabéculas (1/mm)						
Controle	0,0432 (\pm 0,0991)	3,40 (\pm 0,508)	4,17 (\pm 0,404)	<0,001	<0,001	0,328
Biovidro F18	1,32 (\pm 0,511)	2,88 (\pm 0,332)	3,92 (\pm 1,19)	<0,001	<0,001	0,058
β TCF	1,23 (\pm 0,163)	2,47 (\pm 0,321)	4,34 (\pm 0,0602)	0,013	<0,001	<0,001
Controle Vs F18	0,171	0,793	0,998			
Controle Vs β -TCF	0,276	0,134	1			
F18 Vs β -TCF	1	0,94	0,927			
Separação Trabecular (mm)						
Controle	1,08 (\pm 0,118)	0,939 (\pm 0,604)	0,302 (\pm 0,0323)	0,984	<0,001	0,002
Biovidro F18	0,795 (\pm 0,147)	0,437 (\pm 0,0371)	0,332 (\pm 0,125)	0,238	0,048	0,997
β TCF	0,747 (\pm 0,0593)	0,569 (\pm 0,126)	0,272 (\pm 0,0287)	0,993	0,039	0,475
Controle Vs F18	0,533	0,024	1			
Controle Vs β -TCF	0,326	0,201	1			
F18 Vs β -TCF	0,788	0,989	1			
Volume Ósseo (%) (2)						
Controle	2,18 (\pm 1,02)	14,4 (\pm 7,29)	40,4 (\pm 12,6)	0,394	<0,001	<0,001
Biovidro F18	8,91 (\pm 5,20)	28,4 (\pm 12,2)	33,6 (\pm 6,45)	0,023	0,002	0,987
β TCF	6,72 (\pm 1,73)	28,3 (\pm 11,1)	48,5 (\pm 9,89)	0,008	<0,001	0,016
Controle Vs F18	0,94	0,221	0,939			
Controle Vs β -TCF	0,995	0,232	0,846			
F18 Vs β -TCF	1	1	0,165			

Detectamos a presença residual dos biomateriais β -TCF e F18 ao longo dos períodos de estudo. A Figura 5 e a Tabela 2 ilustram níveis semelhantes de biomateriais residuais entre os

grupos β -TCF e F18. Ao considerar a presença do biomaterial como componente integral dos tecidos mineralizados, observamos um aumento significativo no volume total de região mineralizada após 7 dias no grupo F-18 e β -TCF, em comparação com o grupo Controle. Esse aumento foi quantificado em termos de volume ósseo, porcentagem de volume ósseo, e superfície óssea, espessura trabecular, como demonstrado detalhadamente na Figura 5 e Tabela 2.

No entanto, nos demais parâmetros, como espessura trabecular (mm), número de trabéculas (1/mm), separação trabecular (mm) e volume ósseo (% 2), não foram evidenciados aumentos significativos.

Figura 5 . Porcentagem de área de neoformação óssea em relação aos grânulos residuais dos biomateriais β -TCF e F18, apresentados nas imagens: volume ósseo (A), porcentagem de volume ósseo (B), superfície óssea (C), espessura trabecular (D), número de trabéculas (E), separação trabecular (F).

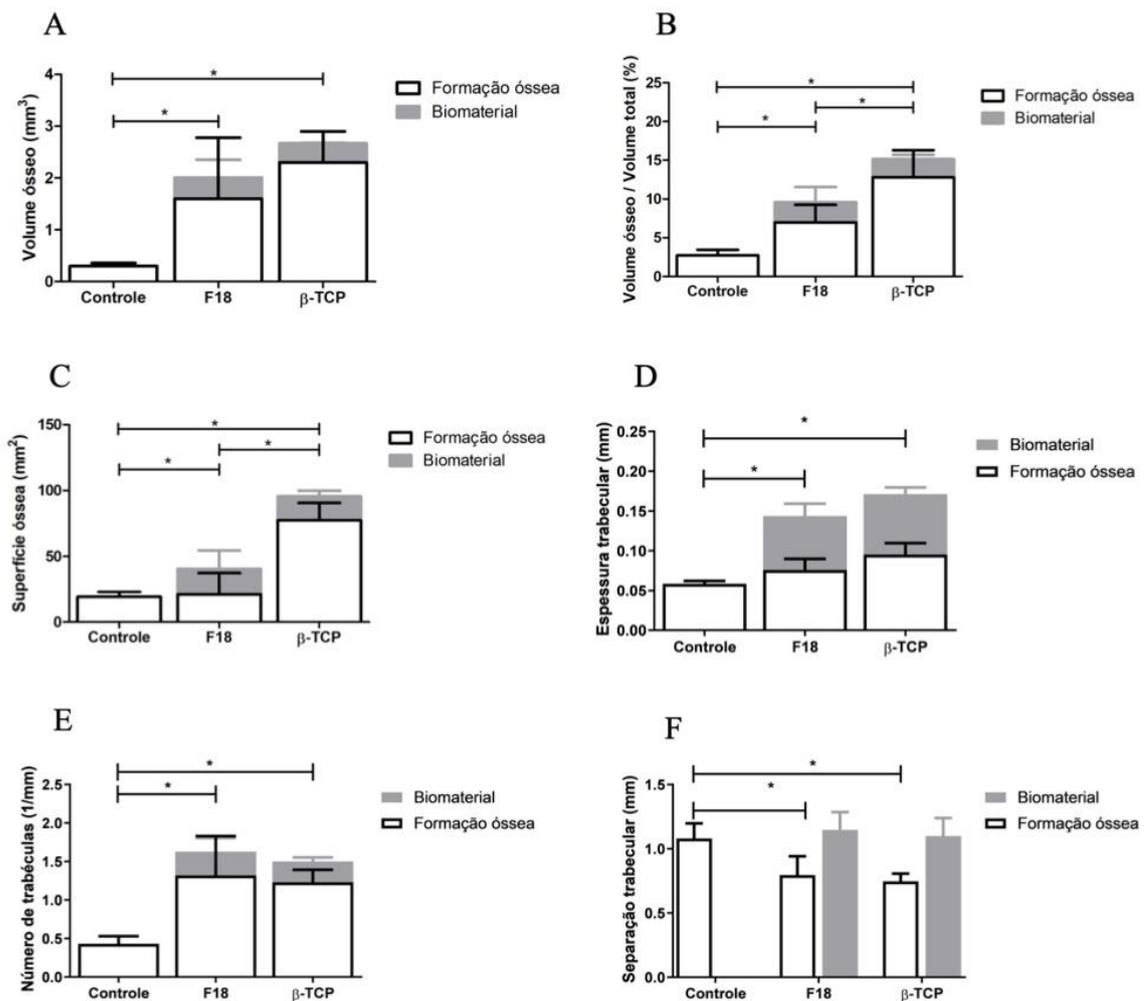


Tabela 2 . Apresenta média e desvio padrão com relação aos grupos e ao tempo de 7 dias da neoformação óssea e resíduos dos biomateriais β -TCF e F18.

	Parâmetros Microtomográficos			p valor (post-hoc)		
	Controle	Biovidro F18	β -TCF	Controle vs F18	Controle vs β -TCF	F18 vs β -TCF
	<i>Volume Ósseo (mm³)</i>					
Formação Óssea	0,3(±0,059)	1,595(±1,176)	2,03(±0,599)	0,049	0,01	0,65
Biomaterial Residual		0,407 (±0,345)	0,367 (± 0,099)			0,952
Região Mineralizada	0,3(±0,059)	2,002(±1,458)	2,397(±0,665)	0,033	0,01	0,782
	<i>Volume Ósseo/Volume Ósseo total (%)</i>					
Formação Óssea	2,742(±0,717)	6,989(±2,768)	12,823(±3,056)	0,044	<0,001	0,007
Biomaterial Residual		2,635 (±1,928)	2,352(±0,57)			0,922
Região Mineralizada	2,742(±0,717)	9,624(±3,541)	15,175(±3,921)	0,011	0<0,001	0,036
	<i>Superfície Óssea (mm²)</i>					
Formação Óssea	19,2129(±3,906)	21,01(±16,291)	77,436(±13,214)	0,968	<0,001	<0,001
Biomaterial Residual		19,488(±13,948)	18,242(±4,328)			0,97
Região Mineralizada	19,2129(±3,906)	40,587(±10,825)	95,677(±16,311)	0,031	<0,001	<0,001
	<i>Espessura Trabecular (mm)</i>					
Formação Óssea	0,0586(±0,004)	0,076(±0,014)	0,095±(0,014)	0,087	<0,001	0,055
Biomaterial Residual		0,068(±0,0154)	0,076(±0,008)			0,433
Região Mineralizada	0,0586(±0,004)	0,144(±0,026)	0,171(±0,020)	<0,001	<0,001	0,101
	<i>Número de Trabéculas (1/mm)</i>					
Formação Óssea	0,432(±0,01)	1,318(±0,511)	1,234(±0,163)	0,002	0,004	0,908
Biomaterial Residual		0,308±(0,177)	0,272(±0,052)			0,854
Região Mineralizada	0,432(±0,01)	1,627(±0,656)	1,506(±0,203)	0,001	0,003	0,885
	<i>Separação Trabecular (mm)</i>					
Formação Óssea	1,0784(±0,11779)	0,795(±0,147)	0,746(±0,059)	0,005	0,002	0,785
Biomaterial Residual		1,147(±0,139)	1,01(±0,14)			0,791

As reconstruções tridimensionais (Figura 6) e as imagens microtomográficas em feixes axiais (figura 7) fornecem uma visualização dos nossos resultados em diferentes intervalos de tempo após a exodontia, especificamente aos 7, 14 e 28 dias. Estas imagens destacam a superior neoformação óssea induzida pelos biomateriais β -TCF e F18 em comparação ao grupo Controle no 7 dia após a exodontia. De forma similar, as reconstruções também demonstram a neoformação óssea comparável entre o grupo Controle, β -TCF e F18 nos períodos de 14 e 28 dias após a exodontia.

Figura 6 . Reconstrução 3D pelo programa CTVox, em regeneração óssea do Grupo Controle (A) 7 dias, (B) 14 dias, (C), 28 dias. Grupo F18 (D) 7 dias, (E) 14 dias, (F) 28 dias. Grupo β -TCF (G) 7 dias, (H) 14 dias, (I) 28 dias.

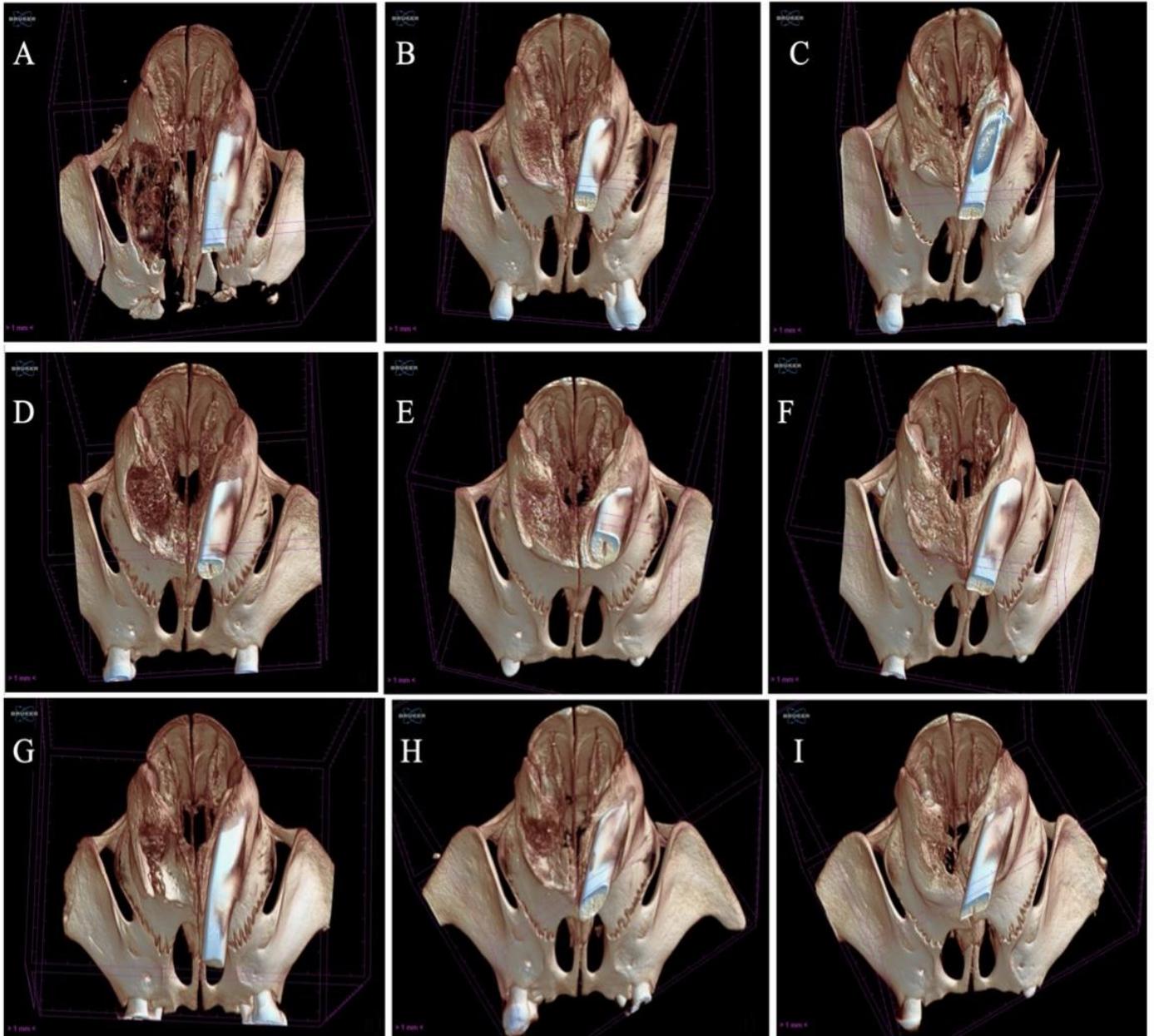
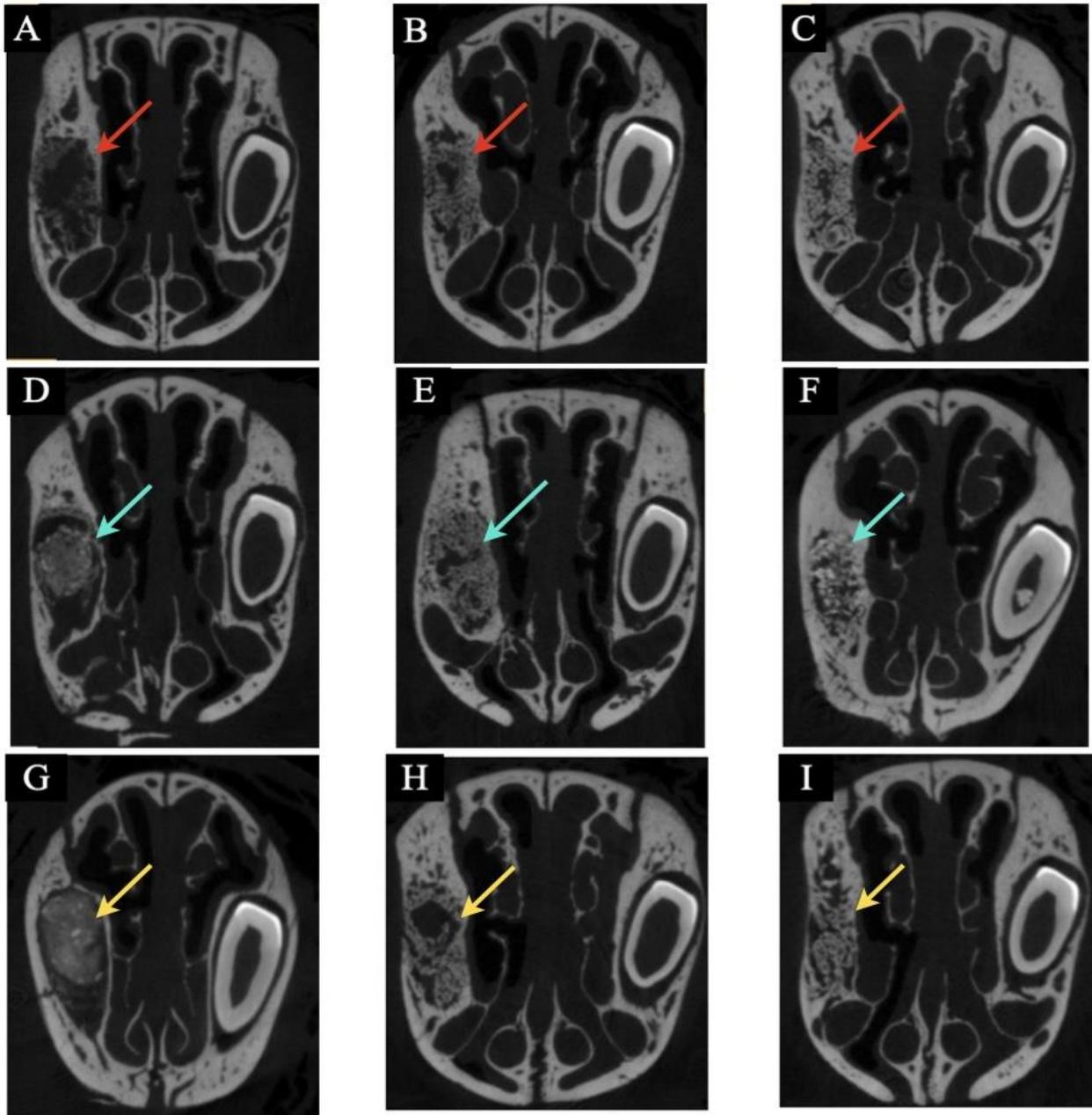


Figura7 . Imagens microtomográficas em feixes axiais dos grupos de estudo, Grupo Controle (A) 7 dias, (B) 14 dias, (C), 28 dias. Grupo F18 (D) 7 dias, (E) 14 dias, (F) 28 dias. Grupo β -TCF (G) 7 dias, (H) 14 dias, (I) 28 dias.



4.2 Análise Histológica

As imagens histológicas relativas ao sétimo dia pós-operatório demonstrou a presença de infiltrado inflamatório crônico e tecido de granulação em todos os grupos de estudo (Figura 8 A, D, e G). Esse processo inflamatório mostrou-se menos intenso após o 14º dia (Figura 8 B, E, e H) diminuindo significativamente até se tornar quase inexistente no 28º dia (Figura 8 C, F, e I). Importante destacar que não foram observadas reações teciduais negativas associadas à presença dos biomateriais, como áreas de necrose ou outras respostas adversas.

A análise também indicou diferenças na persistência dos materiais utilizados: a presença residual de β -TCF foi notadamente menor em comparação com o biovidro F18. Observou-se uma abundância de material residual do biovidro F18 em todos os períodos avaliados, enquanto a presença de β -TCF já era reduzida no sétimo dia pós-operatório, diminuindo ainda mais até o 28º dia de experimentação (Figura 9 D, E, F, G, H e I), onde se pode notar a neoformação óssea entre as granulações do biovidro F18 e as escassas áreas basofílicas, correspondentes aos resíduos de β -TCF, destacadas na imagem (Figura 9 F e I).

Não foram detectadas áreas de colonização microbiana diretamente associadas à presença dos biomateriais nos alvéolos dentários tratados. As observações indicaram que eventuais áreas de colonização microbiana limitaram-se ao terço cervical da ferida cirúrgica, particularmente durante as fases iniciais do processo de cicatrização, notadamente no 7º dia após a operação.

Em todos os grupos a área de neoformação óssea estava permeada por tecido conjuntivo celularizado e hiperemia no 7º. dia pós experimentação.

No 14º dia verificou-se a maior presença de tecido ósseo neoformado, com presença de trabéculas mais espessas e maduras, associadas à redução da área de tecido conjuntivo celularizado em todos os grupos de estudo. No grupo F18 observou-se a permanência da área dos cristais de biovidro enquanto houve uma significativa redução da área basofílica que é representativa dos resíduos do β -TCF.

Aos 28 dias verifica-se a presença de osso neoformado com trabéculas espessas no grupo controle e no grupo β -TCF. No grupo F18 é possível verificar que as trabéculas ósseas estão limitadas as áreas entre os cristais de biovidro.

Figura 8 . As imagens abaixo representam os cortes histológicos dos grupos de estudo com infiltrado inflamatório crônico e tecido de granulação. Controle 7 dias (A), 14 dias (B), 28 dias (C); F18 7 dias (D), 14 dias (E), 28 dias (F); β -TCF 7 dias (H), 14 dias (I), 28 dias (J).

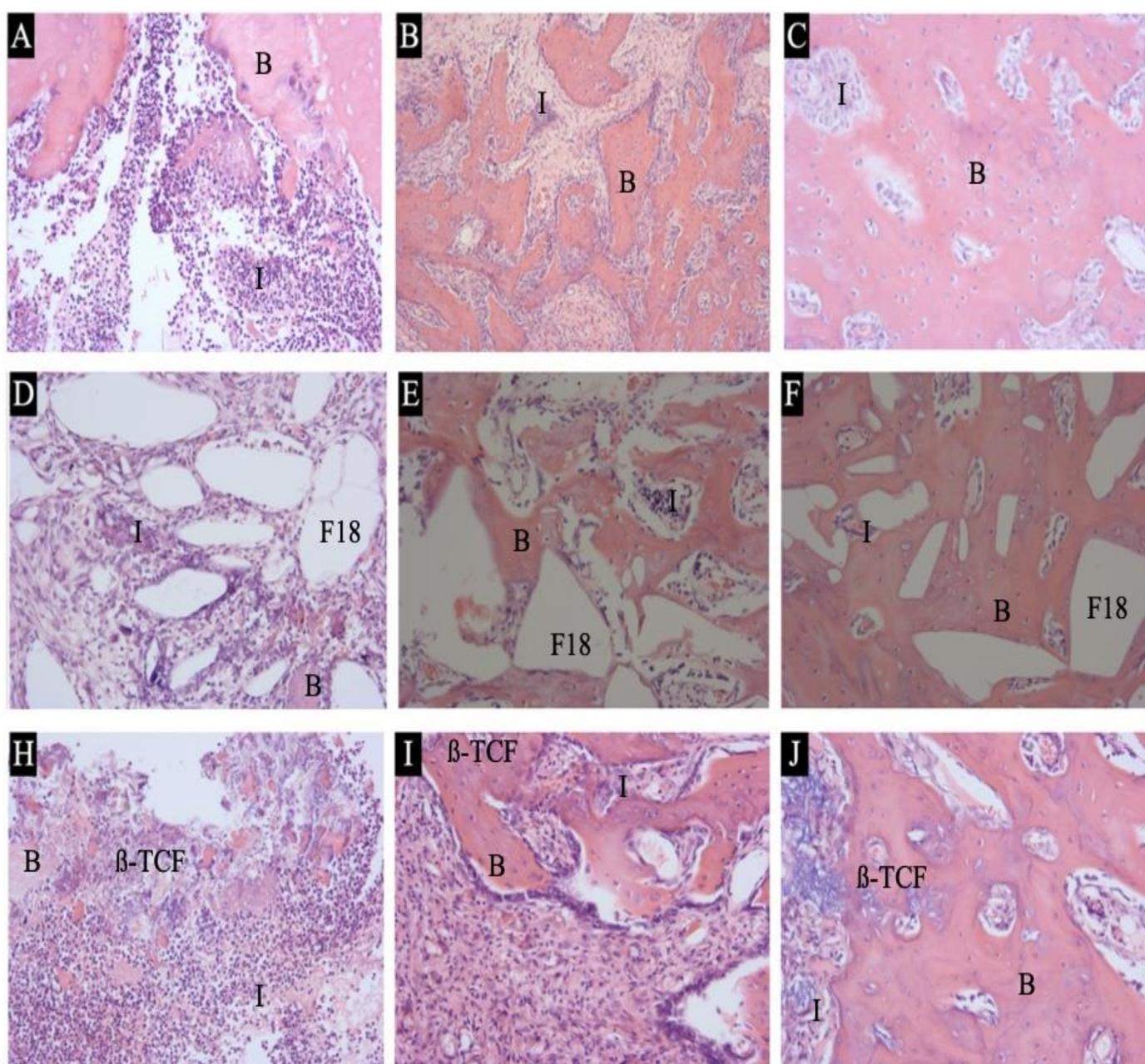
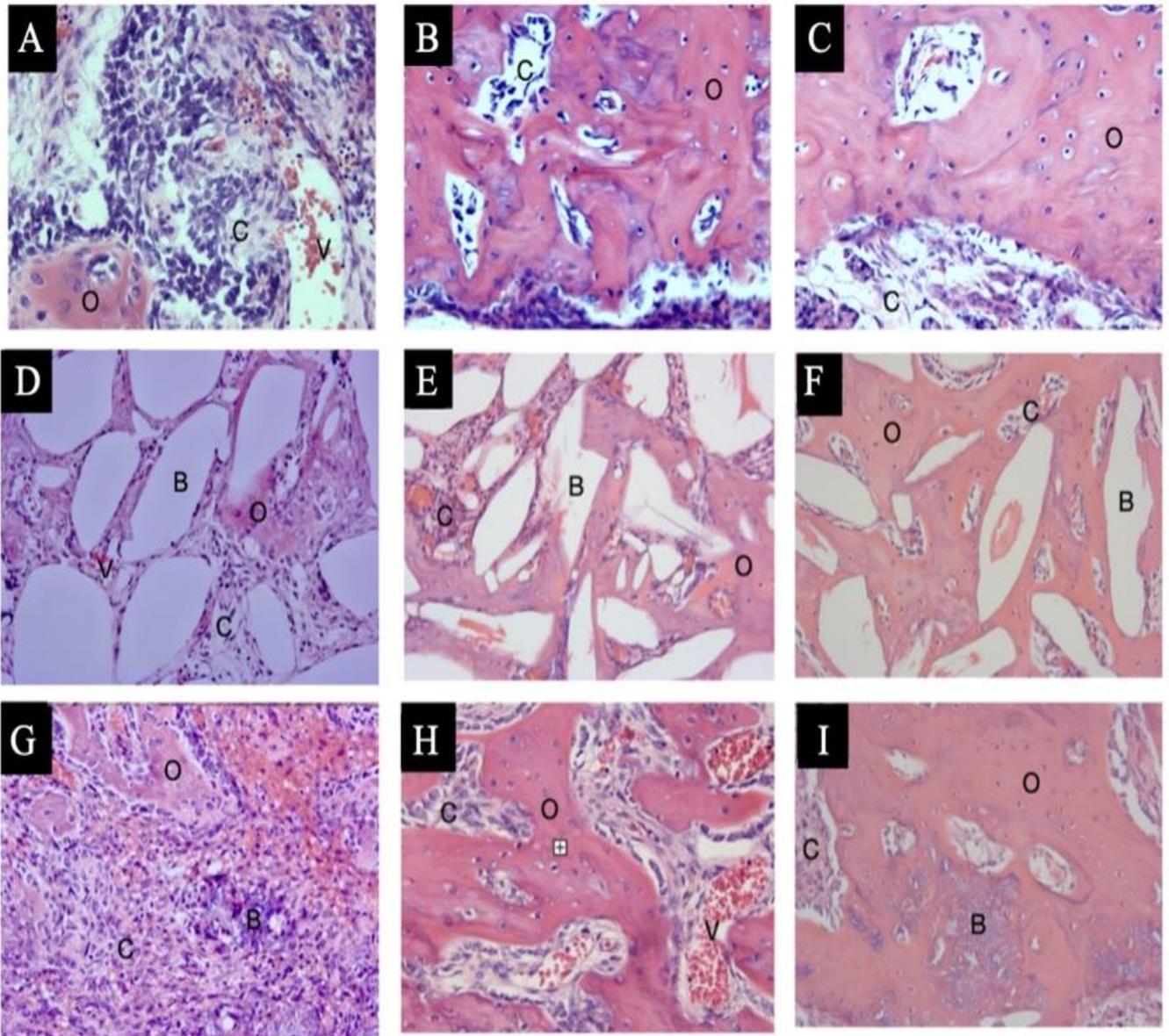


Figura 9. As imagens representam os cortes histológicos dos grupos de estudo, Controle 7 dias (A), 14 dias (B), 28 dias (C); F18 7 dias (D), 14 dias (E), 28 dias (F); β -TCF 7 dias (G), 14 dias (H), 28 dias (I). Descrição na imagem: O - tecido ósseo, C - tecido conjuntivo, V - vasos sanguíneos, B - biomaterial.



DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este estudo representa a primeira comparação direta da eficácia de duas cerâmicas bioativas absorvíveis de terceira geração — biovidro F18 e β -TCF — em estimular a neoformação óssea em alvéolos dentários de ratos imediatamente após exodontia. Observou-se, especialmente nos primeiros 7 dias após o procedimento, um aumento na formação de novo tecido ósseo conduzido pelo β -TCF em comparação com o grupo controle. Contudo, nas análises microtomográficas, o β -TCF não demonstrou superioridade em nenhum parâmetro em relação ao biovidro F18. Nos períodos mais extensos após a exodontia, especificamente aos 14 e 28 dias, a formação óssea foi similar entre os grupos estudados.

A análise microtomográfica não revelou diferenças estatisticamente significativas na formação óssea induzida pelo biovidro F18 quando comparada ao grupo controle, nem diferenças significativas na comparação com o β -TCF. Esses resultados, que apontam para um desempenho similar do biovidro F18 ao do β -TCF, são encorajadores, considerando a ampla utilização do β -TCF em aplicações reparadoras na medicina e odontologia desde 1975 (Eliaz, Metoki, 2017). O β -TCF é conhecido por sua capacidade de estabilizar o coágulo sanguíneo, prevenindo a perda de volume do tecido duro, o que é essencial para a regeneração óssea (Das et al., 2016). Ademais, o β -TCF é reconhecido por sua osteocondução, biocompatibilidade e semelhança com o tecido ósseo, sendo considerado um biomaterial bioativo (Okada et al., 2019).

De maneira similar ao nosso estudo, estudos anteriores como o de Gabbai-Armelin (2017) e Gabbai-Armelin (2015), em tíbias de ratos, e Souza et al. (2015), em calvárias de ratos, não identificaram aumento significativo na formação óssea em feridas tratadas com biovidro F18 em comparação com feridas sem tratamento com biomateriais. No entanto, em nosso estudo, a formação óssea induzida pelo biovidro F18 não foi inferior à promovida pelo β -TCF. Apesar da ausência de um aumento na formação óssea no grupo tratado com biovidro F18, Gabbai-Armelin (2017) observou uma sobreexpressão dos fatores RUNX-2 e RANK-L, os quais estão associados à diferenciação osteoblástica e osteoclástica e à regulação e marcadores osteoblásticos essenciais para o processo de remodelação óssea.

As propriedades osteocondutivas e osteoindutivas do Biovidro F18 são atribuídas à sua capacidade de liberar produtos de dissolução iônica durante a degradação. Esses produtos promovem a formação de hidroxiapatita, vital para a adesão química às fibrilas de colágeno ósseo e, por consequência, para a regeneração tecidual (Marin, Crocave, Zanotto, 2021; Dalmolin et al., 2022). Além disso, o Biovidro F18 tem se mostrado eficiente no estímulo ao

crescimento de tecido vascular e na manifestação de propriedades antimicrobianas contra uma ampla gama de patógenos, incluindo aqueles conhecidos por formar biofilmes e causar osteomielite, como *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Essas características são fundamentais para a prevenção de infecções pós-operatórias em locais de enxertos ósseos (Souza et al., 2017; Passos et al., 2021; Marques et al., 2020). Outro benefício notável do Biovidro F18 é sua capacidade de ser esterilizado sem alterações em sua estrutura, oferecendo uma vantagem significativa na preparação de materiais para uso clínico (Souza et al., 2016).

Azenha et al. (2015), em sua pesquisa sobre biosilicatos (bioglass), analisaram regiões cirúrgicas em calvários de ratos após 7, 14 e 28 dias. O estudo comparou dois grupos: biosilicatos cristalizados e o grupo controle (cicatrização por meio da formação de coágulo). Os resultados revelaram a ausência de infecções pós-cirúrgicas nos períodos de 7, 14 e 28 dias, confirmando as propriedades antimicrobianas dos biomateriais investigados. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados. Surpreendentemente, o grupo controle apresentou resultados superiores aos 28 dias, com 90,2% de formação óssea, em comparação com os biosilicatos cristalizados, que registraram 58% de formação óssea. Este resultado pode ser atribuído às características específicas dos defeitos críticos, onde não houve um suporte adequado ao biomaterial. Apesar dessa discrepância, Azenha et al. (2015) afirmam que os biosilicatos cristalizados exibem excelentes respostas em estudos *in vitro* e *in vivo*, podendo ser aplicados em diferentes situações odontológicas.

Em nossa pesquisa, áreas esparsas de inflamação, caracterizadas por infiltrado polimorfonuclear e células gigantes tipo corpo estranho, foram observadas em todos os grupos estudados, principalmente no 7º dias. Após este período, as áreas inflamatórias reduziram-se significativamente em todos os grupos. Assim, não foi identificada inflamação atribuída diretamente à presença dos biomateriais avaliados. Este achado é consistente com o observado por Jensen e colaboradores (2006), que notaram áreas de infiltrado inflamatório somente nas primeiras duas semanas após a criação de defeitos ósseos na mandíbula de porcos, preenchidos com β -TCF. De forma similar, Gabbai e colaboradores (2017) também relataram a presença de infiltrado inflamatório até o 15º dia após o preenchimento de defeitos ósseos com biovidro F18.

A análise histológica dos alvéolos dentários em ratos destacou uma marcante diferença na presença de biomateriais residuais entre os grupos tratados com β -TCF e biovidro F18. Ao 7º dia após a cirurgia, a presença de β -TCF foi observada de forma esparsa, enquanto o biovidro F18 mostrou suas partículas granulares de maneira evidente em todos os tempos do nosso estudo. Esses achados estão alinhados com a observação de Al Yafi, Alchawaf, e Nelson (2019),

que detectaram a reabsorção mais lenta de certos enxertos aloplásticos, com partículas ainda detectáveis sete meses ou mais após a aplicação. De maneira similar, Gabbai-Armelin e colaboradores (2017) relataram a persistência de partículas residuais de biovidro F18 por até 30 dias em defeitos ósseos induzidos em tíbias, com uma reabsorção quase completa após um período experimental de 60 dias, indicando um processo de reabsorção que se estende além do período contemplado em nosso estudo. Alinhando-se a esses achados, outros estudos, como o de Suehiro et al. (2022), descrevem uma rápida reabsorção do β -TCF em defeitos ósseos, com Jensen et al (2006) observando sua completa reabsorção em até o 30º dia de experimentação.

É relevante ressaltar que, em nossa investigação, o rebordo alveolar permaneceu com suas paredes preservadas. Isso impediu a migração de biomateriais para regiões próximas à lesão óssea. A natureza retentiva do alvéolo dentário do rato pode, de fato, ter otimizado a neoformação óssea quando comparada a defeitos ósseos criados em tíbias ou calvárias, como observado nos estudos de Gabbai-Armelin et al (2017) e Souza et al (2015). A contenção do material enxertado pelas paredes do alvéolo dentário pode ter fornecido um arcabouço para o desenvolvimento interno de células e componentes vasculares, promovendo a neoformação óssea de forma mais eficaz do que o observado em estudos de tíbia e calvária. Pela natureza menos retentiva dos defeitos de tíbia e de calvária possivelmente menores quantidades de biomaterial permaneceram na área de defeito ósseo como apontado por Souza et al (2015) em Vecina (2014).

Semelhante aos estudos de Gabbai-Armelin et al e Souza et al, nossa pesquisa não identificou alterações histológicas que sugerissem citotoxicidade do Biovidro F18, como áreas de inflamação próximas à ferida cirúrgica ou regiões de morte celular. Além disso, destacamos que a colonização microbiana foi observada principalmente no terço cervical do alvéolo dentário em todos os grupos de estudo, especialmente no período de 7 dias. Assim, não encontramos evidências de colonização microbiana diretamente associada à presença dos biomateriais. Esse achado está em consonância com estudos que reconhecem propriedades antimicrobianas tanto no β -TCF (Nayak et al., 2022) quanto no Biovidro F18, reforçando o potencial desses materiais em prevenir infecções bacterianas no sítio da lesão (Azenha et al., 2015, Souza et al., 2017), contribuindo para um ambiente mais propício à regeneração óssea.

Como limitações de nossa pesquisa, ressaltamos que a avaliação da neoformação óssea foi baseada exclusivamente em análises microtomográficas e histomorfométricas, sem considerar a expressão de marcadores específicos relacionados ao processo de reparo ósseo. Adicionalmente, não investigamos a qualidade do osso neoformado nem como os resíduos dos biomateriais poderiam afetar essa qualidade. Outro ponto a destacar é que os intervalos de

tempo escolhidos para a avaliação não permitiram observar a reabsorção completa do biovidro F18, indicando a necessidade de períodos experimentais mais longos para uma análise completa desse processo. Assim, enfatizamos a importância de futuros estudos que avaliem não apenas a quantidade, mas também a qualidade do osso neoformado, incluindo sua dureza, e que considerem períodos experimentais mais extensos para possibilitar a observação da reabsorção total do biovidro F18. É igualmente importante explorar a neoformação óssea sob diferentes condições sistêmicas para uma compreensão mais ampla dos potenciais e limitações dos biomateriais em questão.

Em conclusão, nosso estudo demonstrou uma maior neoformação óssea nos alvéolos dentários de animais tratados com β -TCF em comparação com aqueles que não receberam tratamento com biomaterial. O biovidro F18, por sua vez, não induziu uma neoformação óssea superior à do grupo controle, mas igualmente não apresentou resultados inferiores aos promovidos pelo β -TCF. Este achado é particularmente promissor, considerando que o β -TCF já é um biomaterial estabelecido e amplamente utilizado na odontologia e medicina, reforçando assim o biovidro F18 como uma potencial alternativa para a regeneração óssea.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Concluimos com esse trabalho que:

- β -TCF demonstrou maior promoção da neoformação óssea em comparação ao grupo controle, evidenciados pelos seguintes parâmetros microtomográficos: aumento de volume ósseo, porcentual do volume ósseo, superfície óssea, espessura trabecular e redução na separação trabecular.
- O biovidro F18 apresentou maiores níveis de espessura trabecular e menor separação entre trabéculas do que o grupo controle.
- O biovidro F18 e o β -TCF promoveram neoformação óssea em níveis similares, conforme evidenciado pelos parâmetros microtomográficos: volume ósseo, porcentual de volume ósseo, superfície óssea, espessura trabecular e separação trabecular.
- A utilização de β -TCF e F18 nos alvéolos dos animais resultou em um aumento significativo da neoformação óssea nos estágios iniciais de reparação, particularmente observado no 7º dia após a exodontia.
- Aos 14 e 28 dias após a extração dentária o β -TCF e o F18 apresentaram níveis de neoformação óssea semelhantes ao grupo Controle.
- Não foram observadas reações teciduais ou presença de infiltrado inflamatório associadas à presença dos biomateriais.
- A presença residual do β -TCF foi menor em comparação com o biovidro F18.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Al Yafi F, Alchawaf B, Nelson K. What is the Optimum for Alveolar Ridge Preservation? *Dent Clin North Am.* 2019; 63(3), 399-418.

Azenha MR, Lacerda SA, Marão HF, Peitl Filho O, Magro Filho O. Evaluation of crystallized biosilicate in the reconstruction of calvarial defects. *J Maxillofac Oral Surg.* 2015; 14(3), 659-665.

Azenha MR, Magro Filho O, Peitl Filho O, Toro B, Archilla AR. Reparación ósea en alvéolos de ratas ovariectomizadas con biosilicato cristalizado. Análisis histomorfométrico. *Int. J. Odontostomat.* 2019; 13(2), 162-171.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Goldberg RE, Jensen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* 2012; 25, 1468–1486.

Chappuis V, Araujo MG, Buser D. Clinical relevance of dimensional bone and soft tissue alterations post-extraction in esthetic sites. *Periodontol 2000.* 2017; 73, 73–83.

da Costa RR, da Cunha G, Freitas RDS, Weber JBB. Effects of boric acid on alveolar sockets filling after dental extraction in rats. *Oral Maxillofac Surg.* 2023 Apr 5. doi: 10.1007/s10006-023-01151-9. Epub ahead of print. PMID: 37020145.

Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LFP. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras.* 2010; 56(1), 103-11.

Dalmolin AC, Acevedo LFA, Campos LA, Dechandt ICJ, Serbena FC, Zanotto ED, et al. Effect of bioactive glasses used as dentin desensitizers on the dentin-pulp complex in rats. *Dent Mater J.* 2022;41(6), 874–881.

Das S, Jhingran R, Bains VK, Madan R, Srivastava R, Rizvi I. Socket preservation by beta-tricalcium phosphate with collagen compared to platelet-rich fibrin: A clinico-radiographic study. *Eur J Dent.* 2016; 10(2), 264-276.

Eliaz N, Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials (Basel).* 2017; 10(4), 334.

Freitas GP, Lopes HB, Souza ATP, Oliveira PGFP, Almeida ALG, Souza LEB, Coelho PG, Beloti MM, Rosa AL. Cell Therapy: Effect of locally injected mesenchymal stromal cells derived from bone marrow or adipose tissue on bone regeneration of rat calvarial Defects. *Sci Rep.* 2019; 9(1), 13476.

Gabbai-Armelin PR, Souza MT, Kido HW, Tim CR, Bossini PS, Fernandes KR, Magri AM, Parizotto NA, Fernandes KP, Mesquita-Ferrari RA, Ribeiro DA, Zanotto ED, Peitl O, Renno AC. Characterization and biocompatibility of a fibrous glassy scaffold. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017; 11(4), 1141-1151.

Gabbai-Armelin PR, Souza MT, Kido HW, Tim CR, Bossini PS, Magri AMP, Fernandes KR, Pastor FAC, Zanotto NA, Peitl O, Reno ACM. Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. *J Mater Sci Mater Med.* 2015; 26(5): 177.

Garcia EKI. Doses de agentes para ratos. Universidade Federal de Alfenas, Centro de Bioterismo, 2016.

Gupta A, Chauhan V, Chauhan N, Sharma S, Maheshwari R, Agarwal A. Experimental posterolateral spinal fusion with Beta Tricalcium Phosphate Ceramic and bone marrow aspirate composite graft. *Indian J Orthop.* 2010; 44(4), 402-8.

Henkel K.O., Gerber T., Lenz S., Gundlach K.K., Bienengräber V. Macroscopical, histological, and morphometric studies of porous bone-replacement materials in minipigs 8 months after implantation. *Oral Surg .Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2006; 102, 606–613.

Hench LL. The history of bioglass. *Newspaper of science of materials: materials in medicine*. 2006: 17, 967-978.

Hench LL., Thompson I. 21st century challenges for biomaterials. *Interface J R Soc*. 2010: 7(4), 379-391.

Horváth A, Mardas N, Mezzomo LA, Needleman IG, Donos N. Alveolar ridge preservation. A systematic review. *Clin Oral Investig*. 2013: 17(2), 341-63.

Holzapfel BM, Reichert JC, Schantz JT, Gbureck U, Rackwitz L, Nöth U, Jakob F, Rudert M, Groll J, Hutmacher DW. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013: 65(4), 581–603.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Dados disponíveis em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5256>.

Janssen NG, Schreurs R, de Ruiter AP, Sylvester-Jensen HC, Blindheim G, Meijer GJ, Koole R, Vindenes H. Microstructured Beta-Tricalcium Phosphate for alveolar cleft repair: A Two-Centre Study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2019: 48(6), 708-711.

Jensen SS, Brogгинi N, Hjorting-Hansen E, Schenk R, Buser D. 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 Implants Res* 2006: 17, 237-243.

Marin CP, Crocave MC, Zanotto ED. Competent F18 bioglass-Biosilicate graft scaffold substitutes. *J Eur Ceram Soc*. 2021: 41(7), 7910-7920.

Marques DM, Oliveira VC, Souza MT, Zanotto ED, Issa JPM, Watanabe E. Biomaterials for orthopedics: anti-biofilm activity of a new bioactive glass coating on titanium implants. *Biofouling*. 2020: 36(2), 234-244. doi: 10.1080/08927014.2020.1755842. Epub 2020 Apr 22. PMID: 32321306.

Mezzomo L, Shinkai R, Mardas M, Donos N. Alveolar ridge preservation after dental extraction and before implant placement: A literature review. *Rev Odonto Cienc.* 2011; 26(1), 77-83.

Nampo T, Watahiki J, Enomoto A, Taguchi T, Ono M, Nakano H, Yamamoto G, Irie T, Tachikawa T, Maki K. A new method for alveolar bone repair using extracted teeth for the graft material. *J Periodontol.* 2010; 81(9), 1264-72.

Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell JA. Biomaterials in Orthopaedics. *J. R. Soc. Interface.* 2008; (5), 1137-1158.

Nayak VV, Tovar N, Hacquebord JH, Duarte S, Panariello BHD, Tonon C, Atria PJ, Coelho PG, Witek L. Physicochemical and bactericidal activity evaluation: Silver-augmented 3D-printed scaffolds-An in vitro study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2022; 110(1), 195-209.

Ohba S, Sumita Y, Nakatani Y, Noda S, Asahina I. Alveolar bone preservation by a hydroxyapatite/collagen composite material after tooth extraction. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(5), 2413-2419.

Okada M, Matsuura T, Akizuki T, Hoshi S, Shujaa Addin A, Fukuba S, Izumi Y. Ridge preservation of extraction sockets with buccal bone deficiency using poly lactide-co-glycolide coated β -tricalcium phosphate bone grafts: An experimental study in dogs. *J Periodontol.* 2019; 90(9), 1014-1022. doi: 10.1002/JPER.18-0574. Epub 2019 Mar 12. PMID: 30817006.

Oliveira LSAF., Oliveira CS., Machado APL., Rosa FP. Biomaterials with application in bone regeneration - analysis method and future perspectives.. *R. Ci. Méd. Biol.* 2010; 9(1), 37-44.

Passos TF, Souza MT, Zanotto ED, de Souza CW. Bactericidal activity and biofilm inhibition of F18 bioactive glass against *Staphylococcus aureus*. *Mater Sci Eng C.* 2021; 118, 111475.

Rodrigues MTV. Aplicativo of different materials on alveolar preservation after tooth extraction: a comparative randomized clinical trial. 2022.

Roriz VM, Rosa AL, Peitl O, Zannoto E, Panzeri H, Oliveira PT. Efficacy of bioactive glass-ceramic (Biosilicate®) in the maintenance of alveolar ridges and in osseointegration of titanium implants. *Clin Oral Impl Res* 2010; 21,148-55.

Souza MT. *Desenvolvimento e Caracterização de Tecidos Vítreos Flexíveis Altamente Bioativos*. Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia. Universidade Federal de São Carlos. 2015.

Souza MT, Peitl O, Zannoto ED, Boccaccini AR. Novel double-layered conduit containing highly bioactive glass fibers for potential nerve guide application. *Int Journal of applied glass science*. 2016; 7(2), 183-194.

Souza MT, Renno AC, Peitl O, Zannoto ED. New highly bioactive crystallization resistant glass for tissue engineering applications. *Transl Mater Res*. 2017; 4, 140-02.

Souza MT, Campanni LA, Chinaglia CR, Peitl O, Zannoto ED, Souza CWO. Broad-spectrum bactericidal of a new bioactive grafting material (F18) against clinically important bacterial strains. *Int J Antimicrob Agents*. 2017; 50(6), 730-733.

Suehiro F, Komabashiri N, Masuzaki T, Ishii M, Yanagisawa T, Nishimura M. Efficacy of bone grafting materials in preserving the alveolar ridge in a canine model. *Dent Mater J*. 2022;41(2), 302-308.

Titsinides S, Karatzas T, Perrea D, Eleftheriadis E, Podaropoulos L, Kalyvas D, Katopodis C, Agrogiannis G. Osseous healing in surgically prepared bone defects using different grafting materials: An experimental study in pigs. *Dent J (Basel)* 2020; 8(1), 7.

Vecina CAD. Viabilidade do implante de malha de vidro bioativas e base de biosilicato na regeneração de defeito ósseo craniano de ratos. Faculdade de medicina de Jundiaí - FMJ. Jundiaí. 2014; 84.

Yuan H., Van Den Doel M., Li S., Van Blitterswijk C.A., De Groot K., De Bruijn J.D. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 2002; 13, 1271–1275.

ANEXO A

<small>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO</small>  <small>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</small>	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
--	---

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “Reparo ósseo em alvéolo de ratos usando Biovidro F18 e Beta-Tricálcio-Fosfato de fase pura. Estudo tomográfico e histomorfométrico”, Protocolo nº 2020.1.250.58.0, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Alan Grupioni Lourenço – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 21/10/2020.

Vigência do Projeto	05/01/2021 a 05/01/2023
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico / Hannover
Nº de animais	45
Peso/Idade	250-300g / 8-10 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 21 de outubro de 2020.



Profa. Dra. Andriara De Rossi Daldegan
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICATE CEUA – FORP/USP

We hereby certify that the project entitled “Alveolar bone repair in rats with Bioglass F18 or pure phase Beta-Tricalcium-Phosphate. Tomographic and histomorphometric analyses” Protocol n° 2020.1.250.58.0, under the responsibility of Prof. Dr. Alan Grupioni Lourenço – involving the production, maintenance and/or use of animals from the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for purposes of scientific research (or teaching) – is in accordance with the provisions of Law No. 11.794, of October 8th, 2008, Decree No. 6899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Board of Animal Experimentation Control (CONCEA), with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, and was approved in 21/10/2020.

Duration of the Project	05/01/2021 - 05/01/2023
Species/Lineage	Heterogenic Rats / Hannover
N° of animals	45
Weight / age	250-300 g/ 8-10 weeks-old
Gender	Female
Origin	Central Animal Research Facilities of Campus Ribeirão Preto – University of São Paulo

Ribeirão Preto, October 21st, 2020.


Profa. Dra. Andriara De Rossi Daldegan

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Alveolar Ridge Preservation Following Tooth Extraction: An Experimental Study Comparing β -Tricalcium Phosphate and F18 Bioglass in Rats.

Authors: Melissa Baltoki Chad ¹, Emanuella da Silva Cenci¹, Marina Trevelin Souza ², Gileade Pereira Freitas³, Marcelo Azenha⁴, Alan Grupioni Lourenço^{1*}

1Department of Basic and Oral Biology, Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo, Brazil.

2- Vitreous Materials Laboratory at the Federal University of São Carlos (LaMaV-UFSCar)

3- Faculty of Dentistry of the Federal University of Goiás.

4 - Department of Stomatology, Public Oral Health, and Forensic Dentistry, Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo, Brazil.

* Correspondence:

Alan Grupioni Lourenço, Department of Basic and Oral Biology, Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo, Via do Café s/n, 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil,
Tel +55 16 3315 4060;
E-mail: lourenco@forp.usp.br

ABSTRACT

The reduction in alveolar ridge volume post-tooth extraction can lead to complications in oral rehabilitation using dental implants, as well as aesthetic concerns. Consequently, various alloplastic biomaterials have been engineered to preserve the alveolar bone post-extraction. This study aims to evaluate and compare the efficacy of two third-generation resorbable biomaterials — Bioglass F18 and β -Tricalcium Phosphate (β -TCP) — in promoting new bone formation with in rat post-extraction sockets. β -TCP, a synthetic granulated ceramic, is well-established in clinical use, while Bioglass F18, a high-silica content bioglass.

After the extraction of the right upper incisors in 45 rats, the sockets were either filled with F18, β -TCP, or left to naturally fill with a blood clot for the control group. To quantify new bone formation, five animals from each group were euthanized at intervals of 7, 14, and 28 days post-extraction. Their hemi-maxillae were subsequently analyzed using microtomography and histomorphometry.

Two-way ANOVA analysis revealed no significant differences between the tested groups across most analyzed parameters. However, exceptions were noted in bone volume (mm³), bone volume/total volume (%), and trabecular thickness (mm) at 7 days post-surgery for the β -TCP group, which showed higher levels of new bone growth compared to the control group. While neither biomaterial outperformed the control group in overall new bone formation, their performance was comparable at all experimental times. In conclusion, β -TCP is widely recognized for its effectiveness in promoting new bone formation. Although Bioglass F18 did not exceed β -TCP in all metrics, its ability to support new bone growth was on par with β -TCP. These findings suggest that F18 Bioglass is a promising potential alternative biomaterial for alveolar ridge preservation.

Keywords: F18 bioglass, β -Tricalcium Phosphate, Alveolar Ridge Preservation; Socket preservation

INTRODUCTION

In 2020, the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) highlighted a significant public health issue, reporting that nearly 34 million Brazilians aged 18 and older have lost more than 13 teeth (IBGE, 2020). Implant-supported prosthetic treatments are widely recognized as the most effective method for oral rehabilitation following tooth loss (Ohba et al., 2019). However, tooth extraction initiates a cascade of inflammatory and adaptive responses, leading to a decrease in alveolar bone volume and often rendering the width or height inadequate for dental implant rehabilitation (Mezzomo et al., 2011). Therefore, the preservation of alveolar bone volume post-extraction is critical, especially since immediate rehabilitation with dental implants is frequently not viable (Ohba et al., 2019).

Alloplastic graft materials must meet stringent criteria, including biocompatibility to prevent adverse reactions within the body, and non-toxicity. Beyond these fundamental requirements, such biomaterials are expected to be dynamic, possessing the capacity for remodeling and thus facilitating the formation of new bone tissue (Mezzomo et al., 2011). From a mechanical perspective, it is crucial that these materials exhibit resistance and elasticity comparable to those of the host bone tissue. In this context, bioglasses have emerged as promising candidates for stimulating new bone growth. Also known as bioactive glasses, these vitreous formulations are renowned for their ability to integrate with living tissues, especially bone. The most recognized among them is Bioglass®45S5, with a composition of 45% SiO₂, 24.5% CaO, 24.5% Na₂O, and 6% P₂O₅ (wt. %) (Hench et al., 2006). A novel vitreous formulation, F18 Bioglass, has been tested in various clinical applications within dentistry and medicine, demonstrating superior bone tissue adhesion due to its increased silica content relative to traditional formulations. This enhancement in silica content is considered a critical improvement, offering increased stability and reducing the risk of crystallization (Souza et al, 2016; Souza et al., 2017; Azenha et al., 2019).

The Bioglass F18 and β -Tricalcium Phosphate (β -TCP). β -TCP, a resorbable, synthetic granulated ceramic consisting mainly of Calcium Hydroxide (Ca(OH)₂), and, Phosphoric Acid (H₃PO₄), this material has achieved widespread recognition and utilization in the medical and dental fields for its ability to facilitate bone regeneration and fill defects (Fukuba et al., 2020). Notably, the less stable crystalline structure of β -TCP allows it for a more efficient degradation by osteoclasts, promoting easier tissue integration (Rh Owen et al., 2017, Jensen et al., 2006).

Gupta et al. (2010) reported that the quality of bone formation in the lumbar region of rabbits with β -TCP was comparable to that achieved through autogenous bone grafts. Furthermore, a study carried out in two European reference centers evaluated bone formation in maxillary defects using β -TCP in patients with cleft lip and palate. The outcomes demonstrated significant enhancements in both the quantity and quality of newly formed tissue, with no reported adverse effects, underscoring the reliability of β -TCP as a bone substitute (Janssen et al., 2019).

Tooth extraction, a routine procedure in dental practice, initiates the process of alveolar resorption, posing a significant challenge for future surgical rehabilitation. Despite the availability of various biomaterials for bone grafting, their efficacy remains unpredictably varied. This scenario underscores the imperative to investigate innovative solutions, such as bioglass.

The objective of this study is to assess the efficacy of β -TCP and Bioglass F18 in facilitating new bone formation compared to sockets stimulated with blood clots in rats subjected to unilateral incisor extraction. We hypothesize that sockets filled with Bioglass F18 will exhibit superior bone repair parameters relative to those filled with β -TCP and to sockets that are allowed to heal naturally with clot formation alone.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1 Biomaterials

Bioglass F18, belonging to the $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-K}_2\text{O-MgO-CaO-P}_2\text{O}_5$ system, is produced following a process detailed by (Gabbai-Armelin et al 2017). Supplied by VETRA Biomaterials Ltda. (Ribeirão Preto, SP, Brazil), this biomaterial was provided in granules ranging from 0.1 to 0.2 mm. The production involves the initial mixing of its components, followed by melting. The molten substance is then poured into graphite molds to form cylinders, which are subsequently crushed into particulate matter. Bioglass F18 is stored in hermetically sealed glass containers and sterilized using gamma radiation before experimental application.

β -TCP, a resorbable synthetic granulated ceramic, is composed of Calcium Hydroxide (Ca(OH)_2), Phosphoric Acid (H_3PO_4), and Sucrose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$). Its bone matrix-like composition renders β -TCP an ideal choice for bone tissue replacement or modification, promoting bone formation via osteoconduction. β -TCP is sterilized by gamma radiation, similar to Bioglass F18. For this study, β -TCP, sourced from Bioinnovation Biomedical (Bauru-São Paulo, Brazil), was available in granules ranging from 0.1 to 0.5 mm (Titsinides et al., 2020).

3.2 Animals, Experimentation, and Surgery

This study was conducted at the Oral Biology and Histopathology Laboratory, Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo. This research received ethical approval from the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA/FORP) at the University of São Paulo, under the protocol number 2020.1.250.58.0.

This study involved 45 male rats, *Rattus norvegicus*, Hannover strain, with body weights ranging between 250 and 300 grams. The animals were maintained on a balanced diet with ad libitum access to water and food. They were accommodated in plastic cages (40x32x17 cm), with a maximum of four animals per cage, in a controlled environment that included a 12-hour light/dark cycle and a temperature maintained between 21°C and 25°C. The animals were randomly divided into three groups (n=15), with each group undergoing the extraction of the right upper central incisor: 1. Control Group: the alveoli were left unfilled post-extraction, allowing for natural healing and clot formation; 2. Group F18: the alveoli were filled with F18 bioglass, and; 3. β -TCP Group: the alveoli were filled with β -TCP.

Furthermore, within each group, five animals were scheduled for euthanasia at predetermined post-surgery intervals: 7, 14, and 28 days. This staggered euthanasia schedule was established to evaluate the progression of healing at different time points following surgery.

The sample size calculation was performed using G*Power software, considering an effect size of 0.2 (Damy et al., 2010), a significance level of 5%, and a power of 80%. The calculation was adjusted to accommodate the study's design, which involves three distinct evaluation periods.

For the extraction of the central incisors and the implantation of the biomaterials, the animals were anesthetized using an intraperitoneal injection of Ketamine 80 mg/kg (Ceva, São Paulo, SP, Brazil) combined with Xylazine 5 mg/kg (Syntec, Barueri, SP, Brazil), following the protocol described by Garcia et al. (2016). Post-procedure, each animal received a single intramuscular dose of Veterinary Pentabiotic, 24,000 IU/kg, (Wyeth – São Bernardo do Campo, SP, Brazil), to prevent infection. Additionally, for post-operative analgesia, Ketoprofen (Ceva, São Paulo, SP, Brazil) was administered subcutaneously at a dosage of 5 mg/kg to manage pain. With the animal anesthetized and positioned prone, a syndesmotomy of the upper right incisor was performed, followed by its extraction using specially adapted forceps. Immediately after the extraction, the sockets were treated according to their designated groups. The biomaterials were carefully inserted into the sockets using a pediatric amalgam carrier to ensure the cavity was completely filled. Subsequent to biomaterial placement, the alveoli were sutured with an absorbable multifilament suture (Vycril 4.0, Mononylon, Ethicon, Johnson & Johnson Prod., São José dos Campos, SP, Brazil)

Upon completion of the designated periods of 7, 14, and 28 days, five animals from each group were euthanized at each respective time point. Euthanasia was carried out using an overdose of Ketamine (300 mg/kg) and Xylazine (30 mg/kg), administered intraperitoneally. Following euthanasia, the mandibles were carefully separated from the maxillae using a scalpel blade. The maxilla was bisected through an incision along the median sagittal plane, tracing the intermaxillary suture. A subsequent cut was made tangentially to the distal surface of the molars using straight scissors, facilitating the isolation of the right maxilla. This section encompassed the area of interest—the alveolus of the right central incisor. After dissection, the specimens were fixed in a 4% buffered paraformaldehyde solution for a minimum of 48 hours.

3.3 Microtomographic Analysis

The regions of interest were evaluated using a microtomography system (Model 1276, Invivo - Bruker). The imaging process utilized a 100kV X-ray source, and images were captured by an 11-megapixel camera, achieving a resolution of up to 1 μ m. The comparative and analytical assessment focused on the apical, middle, and cervical thirds of each sample. For this purpose, each third was segmented into 250 slices, starting from the initial appearance of the alveolus image in the scan.

Data-viewer CTAn software facilitated the analysis, enabling the creation of five interpolated drawings for each designated third (apical, middle, and cervical). Evaluation parameters were established as follows: values ranging from 70 to 110 were designated for analyses of bone neoformation, while values from 110 to 255 were assigned for analyses concerning biomaterials or the presence of native bone.

A single researcher, blinded to the biomaterial under assessment and the specific group allocation, conducted the analyses of bone formation. After the microtomographic reconstructions were completed, the analysis of the alveoli in the study animals was conducted across three distinct sections: apical, middle, and cervical thirds. The focus was on the following parameters as outlined by Bouxsein et al. (2010): 1. Volume of bone tissue (mm³); 2. Percentage of newly formed bone tissue volume relative to the total volume of the tooth socket (bone volume/total volume); 3. Bone surface area (mm²); 4. Trabecular thickness (mm); 5. Number of trabeculae (1/mm), and Trabecular separation (mm).

3.4 Histological Processing

After fixation in 4% buffered paraformaldehyde, the right hemi-maxillae were subjected to decalcification using a solution of 20% sodium citrate and 35% formic acid for four days. Following decalcification, the samples were washed for 24 hours in running water, then underwent dehydration, clearing, and were embedded in paraffin. Sections were prepared at a thickness of 60 μ m for subsequent histological analysis.

An independent examiner, blinded to the study groups, conducted the histological evaluation of the alveolar thirds. Microphotography was performed with a Leica DM LB2 microscope (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany), equipped with a Leica DFC 280 digital video camera (Leica Microsystems Imaging AG, Cambridge, England). For each

histological section, observations were made under 20X and 40X objectives, analyzing 15 microscopic fields per alveolus, with five fields allocated to each third.

3.5 Statistical Analysis

The analysis of the results was conducted using JAMOVI software (version 1.6.23), and graphical representations were created with GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, Boston, MA, USA). All statistical analyses were based on two-tailed tests with a 95% confidence interval ($\alpha = 0.05$). Descriptive statistics included point estimates such as medians and quartiles (first quartile – Q1 and third quartile – Q3), in addition to mean and standard deviation as required. The Shapiro-Wilk test was employed to assess the normality of data distribution. For the comparative analysis of continuous variables related to bone repair across different times and study groups, a two-way ANOVA was utilized, followed by Tukey's post-hoc test for specific pairwise comparisons.

4. RESULTS

The time elapsed post-tooth extraction significantly influenced all evaluated microtomographic parameters. Specifically, bone volume, the bone volume/total volume ratio, and bone surface area exhibited highly significant changes ($p < 0.001$). Furthermore, trabecular thickness demonstrated significant variation over time ($p = 0.012$), as did the number of trabeculae and trabecular separation ($p < 0.001$ for both).

The analysis highlighted that new bone formation increased progressively, with the most notable enhancement observed at 28 days post-extraction. Importantly, the measurements for bone volume, bone surface area, and trabecular thickness at the 14 and 28-day intervals showed comparable results, indicating a significant phase of bone regeneration during these periods. These findings are detailed in Figure 1 and Table 1, which present the impact of time across the different study groups.

In the comparison of the effects of different biomaterials on bone formation, β -TCP significantly enhanced bone neoformation relative to the control group at 7 day post implantation. Specifically, β -TCP demonstrated a notable improvement in several microtomographic parameters: bone volume ($p = 0.016$), percentage of bone volume relative to total volume ($p = 0.033$), bone surface area ($p = 0.027$), and trabecular thickness ($p < 0.001$), alongside a decrease in trabecular separation ($p = 0.012$). In contrast, F18 bioactive glass, when compared to the control group, also showed an increase in trabecular thickness ($p = 0.005$) and a reduction in trabecular separation ($p = 0.01$). While the other parameters did not reveal significant differences between F18 and the control group, the performance of F18 was comparable to that of β -TCP in terms of bone volume ($p = 0.82$), percentage of bone volume ($p = 0.066$), bone surface area ($p = 0.435$), trabecular thickness ($p = 0.204$), and trabecular separation ($p = 0.995$).

At 14 days post-tooth extraction, both β -TCP and Bioglass F18 exhibited levels of new bone formation that were comparable to those observed in the Control group. The exception to this was the microtomographic parameter of trabecular separation; in this case, the F18 group demonstrated a significantly reduced separation between trabeculae compared to the Control group ($p = 0.024$). By 28 days after extraction, the microtomographic parameters, indicating various aspects of bone formation and structure, showed no significant differences between all the study groups.

Microtomographic images (Figure 2) and photomicrographs (Figure 3) offer a visual representation of our findings. Histological evaluations conducted 7 days postoperatively revealed the presence of chronic inflammatory infiltrate and granulation tissue across all study groups. This inflammatory response diminished in intensity by the 14th day and decreased significantly, becoming nearly absent by the 28th day. Notably, throughout the study, no adverse tissue reactions to the biomaterials, such as necrosis or other negative responses, were detected. Furthermore, our analysis highlighted differences in the persistence of the materials applied. β -TCP exhibited a significantly lower residual presence compared to F18 bioglass. While substantial amounts of F18 bioglass remained at all evaluated time points, the detectable quantity of β -TCP diminished considerably by the 7th postoperative day and continued to decrease until the 28th day. These observations are visually supported by Figure 3, illustrating the comparative persistence of the materials.

5. DISCUSSION

This study is the first to compare the efficacy of two third-generation absorbable bioactive ceramics—F18 bioactive glass and β -TCP—in stimulating new bone formation in rat dental alveoli following tooth extraction. Notably, the initial 7 days post-procedure witnessed an increase in new bone tissue formation induced by β -TCP when compared to the control group. However, microtomographic analyses did not show β -TCP to be superior in any parameter over F18 bioglass. At longer intervals post-extraction, specifically at 14 and 28 days, bone formation between the groups studied showed no significant differences.

Microtomographic analysis revealed no statistically significant differences in bone formation induced by F18 bioglass when compared to the control group, nor significant differences when compared to β -TCP. These results, highlighting a similar performance of F18 bioglass to that of β -TCP, are encouraging, considering the wide use of β -TCF in reparative applications in medicine and dentistry since 1975 (Eliaz & Metoki, 2017). β -TCP is known for its ability to stabilize the blood clot, preventing loss of hard tissue volume, which is essential for bone regeneration (Das et al., 2016). Furthermore, β -TCF is recognized for its osteoconduction, biocompatibility, and similarity with bone tissue, being considered a bioactive biomaterial (Okada et al., 2019).

Consistent with our findings, previous research, including studies by Gabbai-Armelin (2015) on rat tibias and Souza et al. (2016) on rat calvarias, did not demonstrate a significant increase in bone formation in wounds treated with F18 bioglass compared to untreated wounds. Nevertheless, in our study, bone formation induced by F18 bioglass was comparable to that promoted by β -TCF. Although higher bone formation was not observed in the group treated with F18 bioglass, Gabbai-Armelin (2015) reported an overexpression of RUNX-2 and RANK-L factors, crucial for osteoblastic and osteoclastic differentiation, as well as for the regulation of markers critical to the bone remodeling process.

Other important aspect that can be observed in the histological analysis, in the difference between bone formation patterns between biomaterials. As reported by Oonishi et al. (1999), class a bioactivity bioglasses (in their study Bioglass 45S5) tend to demonstrate a bone growth initiating from the bioglass's surface, slowly surrounding the particle and closing their gaps, while other bioceramics, such as β -TCF, demonstrate a bone formation that starts in the wound periphery and grow as the particles dissolve.

The osteoconductive and osteoinductive properties of Bioglass F18 are ascribed to its release of ionic dissolution products during degradation. These ions facilitate the formation of hydroxyapatite, essential for chemical bonding to bone collagen fibrils, thus supporting tissue regeneration (Marin et al., 2021; Dalmolin et al., 2022). Additionally, Bioglass F18 has shown effectiveness in promoting vascular tissue growth and exhibits antimicrobial properties against a broad spectrum of pathogens both in planktonic and biofilm forms, crucial for preventing postoperative infections at bone graft sites (Souza et al., 2017; Passos et al., 2021; Marques et al., 2020). Moreover, the stability of Bioglass F18 during sterilization processes without structural alterations offers a significant advantage in clinical material preparation (Souza et al., 2016).

In our study, we noted inflammatory areas characterized by polymorphonuclear infiltrate and foreign body giant cells across all groups, predominantly at the 7-day mark. Following this initial period, the extent of inflammation significantly diminished in all groups, suggesting that the inflammation was not directly related to the biomaterials under investigation. This observation is consistent with Jensen et al. (2006), who observed inflammatory infiltrate only within the first two weeks post-creation of bone defects in the mandibles of pigs filled with β -TCP and Gabbai-Armelin et al. (2017) who reported the presence of inflammatory infiltrate persisting until the 15th day post-filling of bone defects with F18 bioglass.

Histological analysis of rat dental alveoli revealed significant differences in the persistence of residual biomaterials between groups treated with β -TCP and F18 bioglass. By the 7th day post-surgery, β -TCP was scarcely present, in contrast to F18 bioglass, whose granular particles remained prominently visible throughout our study. These observations align with Gabbai-Armelin (2017), who noted the presence of residual F18 bioglass particles up to 30 days post-implantation in tibial bone defects, with nearly complete resorption after 60 days, indicating a reabsorption timeline for F18 bioglass that extends beyond the scope of our study. Similarly, rapid reabsorption of β -TCP in bone defects was documented by Suehiro et al. (2022), with Jensen (2006) reporting its complete reabsorption by the 30th day post-implantation.

Our research significantly highlighted that the alveolar ridge retained its integrity, with intact walls, thereby preventing the dispersion of biomaterials into areas adjacent to the bone lesion.

This retention characteristic of the rat dental alveoli likely played a pivotal role in enhancing new bone formation, unlike bone defects observed in tibias or calvarias, as documented by Gabbai-Armelin et al. (2017) and Souza et al. (2016). The containment of biomaterials within the dental socket walls may have created a conducive environment for the internal proliferation of cells and vascular components, fostering a more efficient bone regeneration than observed in tibial and calvarial studies.

Consistent with the findings of Gabbai-Armelin et al. (2017) and Souza et al. (2016), our study found no histological signs of cytotoxicity linked to Bioglass F18, such as inflammation near the surgical site or areas of cellular necrosis. Moreover, microbial colonization was observed predominantly in the cervical third of the tooth socket across all groups, notably at the 7-day mark. Consequently, our results do not support a direct association between microbial colonization and the presence of biomaterials. This aligns with prior research recognizing the antimicrobial properties of both β -TCP (Nayak et al., 2022) and Bioglass F18 (Azenha et al., 2015; Souza et al., 2017; Passos et al., 2021; Marques et al., 2020; Oliveira et al., 2020), suggesting their potential in mitigating infection risks.

Our research has certain limitations that warrant mention. Primarily, the evaluation of bone neoformation was confined to microtomographic and histomorphometric analyses, without assessing specific markers critical to the bone repair process. Additionally, our investigation did not explore the quality of the newly formed bone or the potential impact of residual biomaterials on this quality. The selected time intervals for evaluation also precluded the observation of complete reabsorption of F18 bioglass, indicating the need for longer experimental durations to fully analyze this aspect. Future studies should therefore encompass not only the assessment of the quantity but also the quality of newly formed bone, including properties such as hardness. Extending experimental timelines will be essential for observing the full resorption process of F18 bioglass. Moreover, investigating bone formation under varied systemic conditions will be paramount for a comprehensive understanding of the biomaterials' capabilities and limitations.

In conclusion, our study demonstrated enhanced bone formation in dental alveoli treated with β -TCP compared to untreated controls. While F18 bioglass did not lead to higher bone formation than the other studies groups, its outcomes were comparable to those achieved with β -TCP. This finding is particularly encouraging, given the extensive use and established

efficacy of β -TCP in dentistry and medicine. It highlights the potential of F18 bioglass as a viable alternative for bone regeneration applications.

REFERENCES

- Azenha MR, Lacerda SA, Marão HF, Peitl Filho O, Magro Filho O. Evaluation of crystallized biosilicate in the reconstruction of calvarial defects. *J Maxillofac Oral Surg.* 2015; 14(3); 659-665.
- Azenha MR, Magro Filho O, Peitl Filho O, Toro B, Archilla AR. Reparación ósea en alvéolos de ratas ovariectomizadas con biosilicato cristalizado. Análisis histomorfométrico. *Int. J. Odontostomat.*, 2019; 13(2), 162-171.
- Bouxsein, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* 2012; (25), 1468–1486.
- Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LFP. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras.* 2010; 56(1), 103-11.
- Dalmolin AC, Acevedo LFA, Campos LA, Dechandt ICJ, Serbena FC, Zanotto ED, et al. Effect of bioactive glasses used as dentin desensitizers on the dentin-pulp complex in rats. *Dent Mater J.* 2022;41(6):874–881
- Das S, Jhingran R, Bains VK, Madan R, Srivastava R, Rizvi I. Socket preservation by beta-tricalcium phosphate with collagen compared to platelet-rich fibrin: A clinico-radiographic study. *Eur J Dent.* 2016 Apr-Jun;10(2):264-276. doi: 10.4103/1305-7456.178298. PMID: 27095909; PMCID: PMC4813448.
- Eliaz N, Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials (Basel).* 2017 Mar 24;10(4):334. doi: 10.3390/ma10040334.
- Fukuba S, Akizuki T, Matsuura T, Okada M, Nohara K, Hoshi S, Shujaa Addin A, Iwata T, Izumi Y. Effects of combined use of recombinant human fibroblast growth factor-2 and β -tricalcium phosphate on ridge preservation in dehiscence bone defects after tooth extraction:

A split-mouth study in dogs. *J Periodontal Res.* 2021 Apr;56(2):298-305. doi: 10.1111/jre.12818.

Gabbai-Armelin PR, Souza MT, Kido HW, Tim CR, Bossini PS, Fernandes KR, Magri AM, Parizotto NA, Fernandes KP, Mesquita-Ferrari RA, Ribeiro DA, Zanotto ED, Peitl O, Renno AC. Characterization and biocompatibility of a fibrous glassy scaffold. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017 Apr;11(4):1141-1151. doi: 10.1002/term.2017. Epub 2015 Feb 25. PMID: 25712803.

Garcia EKI. Doses de agentes para ratos. Universidade Federal de Alfenas, Centro de Bioterismo, 2016.

Gupta A, Chauhan V, Chauhan N, Sharma S, Maheshwari R, Agarwal A. Experimental posterolateral spinal fusion with Beta Tricalcium Phosphate Ceramic and bone marrow aspirate composite graft. *Indian J Orthop.* 2010; 44(4), 402-8.

Henkel K.O., Gerber T., Lenz S., Gundlach K.K., Bienengräber V. Macroscopical, histological, and morphometric studies of porous bone-replacement materials in minipigs 8 months after implantation. *Oral Surg .Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2006; 102, 606–613.

Hench LL. The history of bioglass. *Newspaper of science of materials: materials in medicine.* 2006; 17: 967-978.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Data available at: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5256>.

Janssen NG, Schreurs R, de Ruitter AP, Sylvester-Jensen HC, Blindheim G, Meijer GJ, Koole R, Vindenes H. Microstructured Beta-Tricalcium Phosphate for alveolar cleft repair: A Two-Centre Study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2019; 48(6), 708-711.

Jensen SS, Broggini N, Hjørtting-Hansen E, Schenk R, Buser D. 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 Implants Res* 2006; 17: 237-243.

Marin CP, Crocave MC, Zanotto ED. Competent F18 bioglass-Biosilicate graft scaffold substitutes. *J Eur Ceram Soc.* 2021; 41(7): 7910-7920. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2021.7910-7920.

Marques DM, Oliveira VC, Souza MT, Zanotto ED, Issa JPM, Watanabe E. Biomaterials for orthopedics: anti-biofilm activity of a new bioactive glass coating on titanium implants. *Biofouling.* 2020 Feb;36(2):234-244. doi: 10.1080/08927014.2020.1755842. Epub 2020 Apr 22. PMID: 32321306.

Mezzomo L, Shinkai R, Mardas M, Donos N. Alveolar ridge preservation after dental extraction and before implant placement: A literature review. *Rev Odonto Cienc.* 2011; 26(1), 77-83.

Nayak VV, Tovar N, Hacquebord JH, Duarte S, Panariello BHD, Tonon C, Atria PJ, Coelho PG, Witek L. Physicochemical and bactericidal activity evaluation: Silver-augmented 3D-printed scaffolds-An in vitro study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2022. 110(1): 195-209.

Ohba S, Sumita Y, Nakatani Y, Noda S, Asahina I. Alveolar bone preservation by a hydroxyapatite/collagen composite material after tooth extraction. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(5), 2413-2419.

Okada M, Matsuura T, Akizuki T, Hoshi S, Shujaa Addin A, Fukuba S, Izumi Y. Ridge preservation of extraction sockets with buccal bone deficiency using poly lactide-co-glycolide coated β -tricalcium phosphate bone grafts: An experimental study in dogs. *J Periodontol.* 2019 Sep;90(9):1014-1022. doi: 10.1002/JPER.18-0574.

Oliveira LSAF., Oliveira CS., Machado APL., Rosa FP. Biomaterials with application in bone regeneration - analysis method and future perspectives.. *R. Ci. Méd. Biol.* 2010; 9(1): 37-44.

Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Kushitani S, Iwaki H. Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. *Journal of Biomedical Research.* 1999; 44(1): 31-43.

Passos TF, Souza MT, Zanotto ED, de Souza CW. Bactericidal activity and biofilm inhibition of F18 bioactive glass against *Staphylococcus aureus*. *Mater Sci Eng C*. 2021; 118: 111475. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111475.

Rh Owen G, Dard M, Larjava H. Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018 Aug;106(6):2493-2512. doi: 10.1002/jbm.b.34049. Epub 2017 Dec 20. PMID: 29266701.

Souza MT, Peitl O, Zanotto ED, Boccaccini AR. Novel double-layered conduit containing highly bioactive glass fibers for potential nerve guide application. *Int Journal of applied glass science*. 2016 7(2):183-194.

Souza MT, Renno AC, Peitl O, Zanotto ED. New highly bioactive crystallization resistant glass for tissue engineering applications. *Transl Mater Res*. 2017; 4, 140-02.

Souza MT, Campanni LA, Chinaglia CR, Peitl O, Zanotto ED, Souza CWO. Broad-spectrum bactericidal of a new bioactive grafting material (F18) against clinically important bacterial strains. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 Dec 50(6):730-733.

Suehiro F, Komabashiri N, Masuzaki T, Ishii M, Yanagisawa T, Nishimura M. Efficacy of bone grafting materials in preserving the alveolar ridge in a canine model. *Dent Mater J*. 2022;41(2):302-308

Titsinides S, Karatzas T, Perrea D, Eleftheriadis E, Podaropoulos L, Kalyvas D, Katopodis C, Agrogiannis G. Osseous healing in surgically prepared bone defects using different grafting materials: An experimental study in pigs. *Dent J (Basel)* 2020; 8(1), 7.

The jamovi project (2022). *jamovi*. (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

Figures

Figure 1: Comparative analysis of alveolar bone neoformation across Control, Bioglass F18 (F18), and β -Tricalcium Phosphate (β -TCP) Groups, utilizing microtomographic parameters such as bone volume (A), percentage of bone volume (B), bone surface area (C), trabecular thickness (D), number of trabeculae (E), and trabecular separation (F).

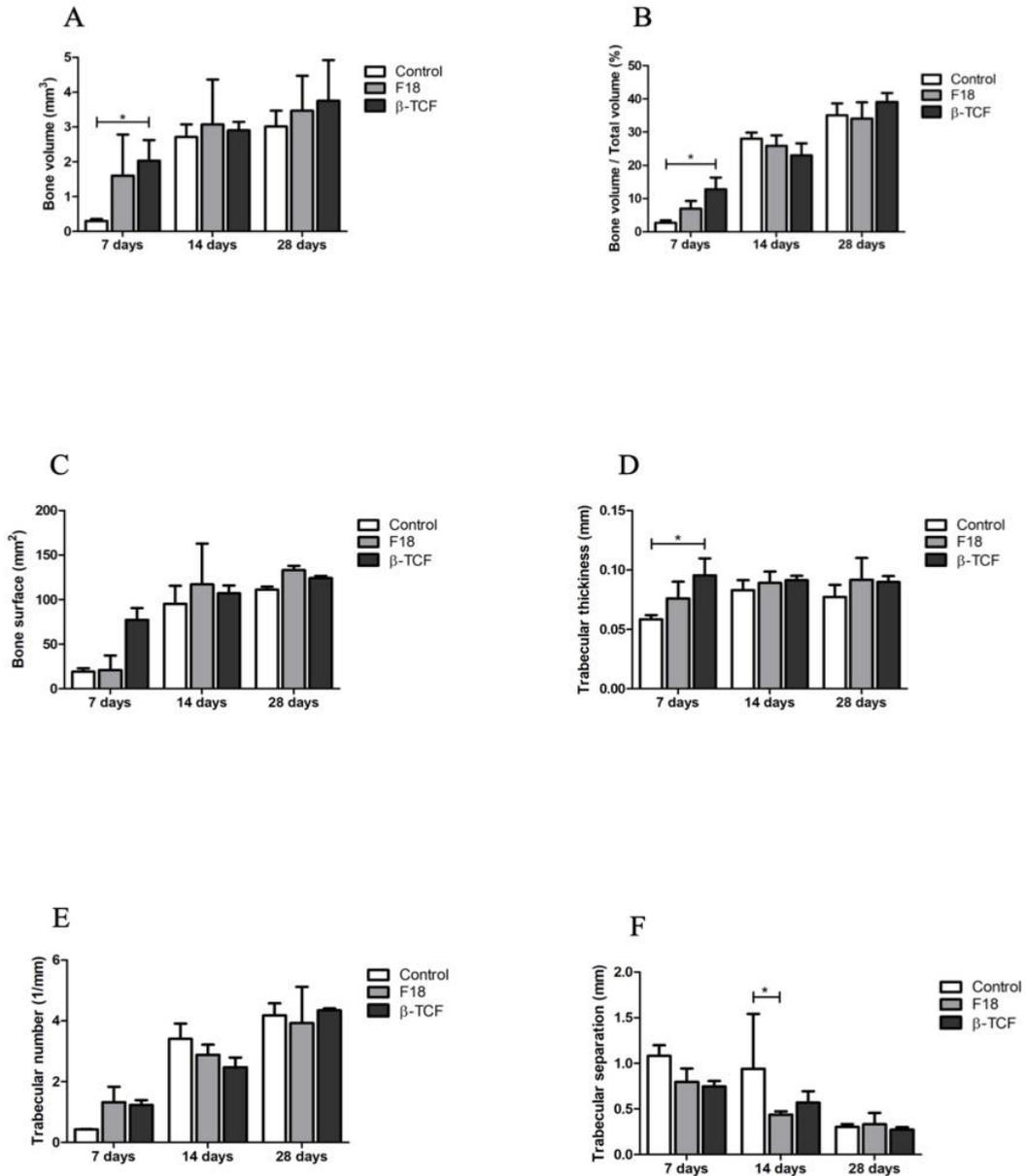


Table 1: Descriptive and Statistical Analysis of Alveolar Bone Neof ormation. This table details the mean, standard deviation, and results of statistical analyses for alveolar bone neof ormation among the Control group, and groups treated with Bioglass F18 (F18) and β -Tricalcium Phosphate (β -TCP), across microtomographic parameters at 7, 14, and 28 days post-treatment.

	Microtomographic Parameters			p value (post-hoc)		
	7 days	14 days	28 days	7 vs 14 days	7 vs 28 days	14 vs 28 days
Bone Volume (mm³)						
Control	0,300 (\pm 0,0595)	2,71 (\pm 0,363)	3,01 (\pm 0,459)	0,001	<0,001	1
Bioglass F18	1,60 (\pm 1,18)	3,07 (\pm 1,29)	3,47 (\pm 1,0)	0,146	0,025	0,997
β TCF	2,03 (\pm 0,599)	2,9 (\pm 0,246)	3,75 (\pm 1,17)	0,762	0,052	0,793
Control Vs F18	0,279	0,999	0,992			
Control Vs β -TCF	0,049	1	0,885			
F18 Vs β -TCF	0,995	1	1			
Bone Volume (%)						
Control	2,74 (\pm 0,717)	28,0 (\pm 1,86)	35,1 (\pm 3,54)	<0,001	<0,001	0,023
Bioglass F18	6,99 (\pm 2,27)	25,9 (\pm 3,11)	34,1 (\pm 4,89)	<0,001	<0,001	0,005
β TCF	12,8 (\pm 3,51)	23 (\pm 3,6)	39,1 (\pm 2,65)	<0,001	<0,001	<0,001
Control Vs F18	0,456	0,975	1			
Control Vs β -TCF	<0,001	0,248	0,564			
F18 Vs β -TCF	0,109	0,863	0,255			
Bone Surface (mm²)						
Control	19,2 (\pm 3,91)	95,3 (\pm 20,3)	111 (\pm 10,6)	0,004	<0,001	0,994
Bioglass F18	21,1 (\pm 16,3)	117 (\pm 45,9)	133 (\pm 52,3)	<0,001	<0,001	0,991
β TCF	77,4 (\pm 13,2)	107 (\pm 8,92)	124 (\pm 34,5)	0,761	0,21	0,987
Control Vs F18	1	0,951	0,942			
Control Vs β -TCF	0,052	0,994	0,997			
F18 Vs β -TCF	0,067	1	1			
Trabecula Thickness (mm)						
Control	0,0586 (\pm 0,00352)	0,0829 (\pm 0,00851)	0,0773 (\pm 0,0101)	0,018	0,133	0,994
Bioglass F18	0,0760 (\pm 0,0140)	0,0890 (\pm 0,00009)	0,0917 (\pm 0,0184)	0,563	0,317	1
β TCF	0,0954 (\pm 0,0143)	0,0913 (\pm 0,00375)	0,0898 (\pm 0,00501)	0,999	0,994	1
Control Vs F18	0,198	0,989	0,43			
Control Vs β -TCF	<0,001	0,932	0,616			
F18 Vs β -TCF	0,107	1	1			
Trabecular Number (1/mm)						
Control	0,0432 (\pm 0,0991)	3,40 (\pm 0,508)	4,17 (\pm 0,404)	<0,001	<0,001	0,328
Bioglass F18	1,32 (\pm 0,511)	2,88 (\pm 0,332)	3,92 (\pm 1,19)	<0,001	<0,001	0,058
β TCF	1,23 (\pm 0,163)	2,47 (\pm 0,321)	4,34 (\pm 0,602)	0,013	<0,001	<0,001
Control Vs F18	0,171	0,793	0,998			
Control Vs β -TCF	0,276	0,134	1			
F18 Vs β -TCF	1	0,94	0,927			
Trabecular Separation (mm)						
Control	1,08 (\pm 0,118)	0,939 (\pm 0,604)	0,302 (\pm 0,0323)	0,984	<0,001	0,002
Bioglass F18	0,795 (\pm 0,147)	0,437 (\pm 0,0371)	0,332 (\pm 0,125)	0,238	0,048	0,997
β TCF	0,747 (\pm 0,0593)	0,569 (\pm 0,126)	0,272 (\pm 0,0287)	0,993	0,039	0,475
Control Vs F18	0,533	0,024	1			
Control Vs β -TCF	0,326	0,201	1			
F18 Vs β -TCF	0,788	0,989	1			
Bone Volume (%) (2)						
Control	2,18 (\pm 1,02)	14,4 (\pm 7,29)	40,4 (\pm 12,6)	0,394	<0,001	<0,001
Bioglass F18	8,91 (\pm 5,20)	28,4 (\pm 12,2)	33,6 (\pm 6,45)	0,023	0,002	0,987
β TCF	6,72 (\pm 1,73)	28,3 (\pm 11,1)	48,5 (\pm 9,89)	0,008	<0,001	0,016
Control Vs F18	0,94	0,221	0,939			
Control Vs β -TCF	0,995	0,232	0,846			
F18 Vs β -TCF	1	1	0,165			

Figure 2: Axial Microtomographic Images of New Bone Formation. These images showcase the progression of new bone formation within the right dental alveoli at 7, 14, and 28 days post-extraction in the Control group (A-C), F-18 group (D-F), and β -Tricalcium Phosphate group (G-I).

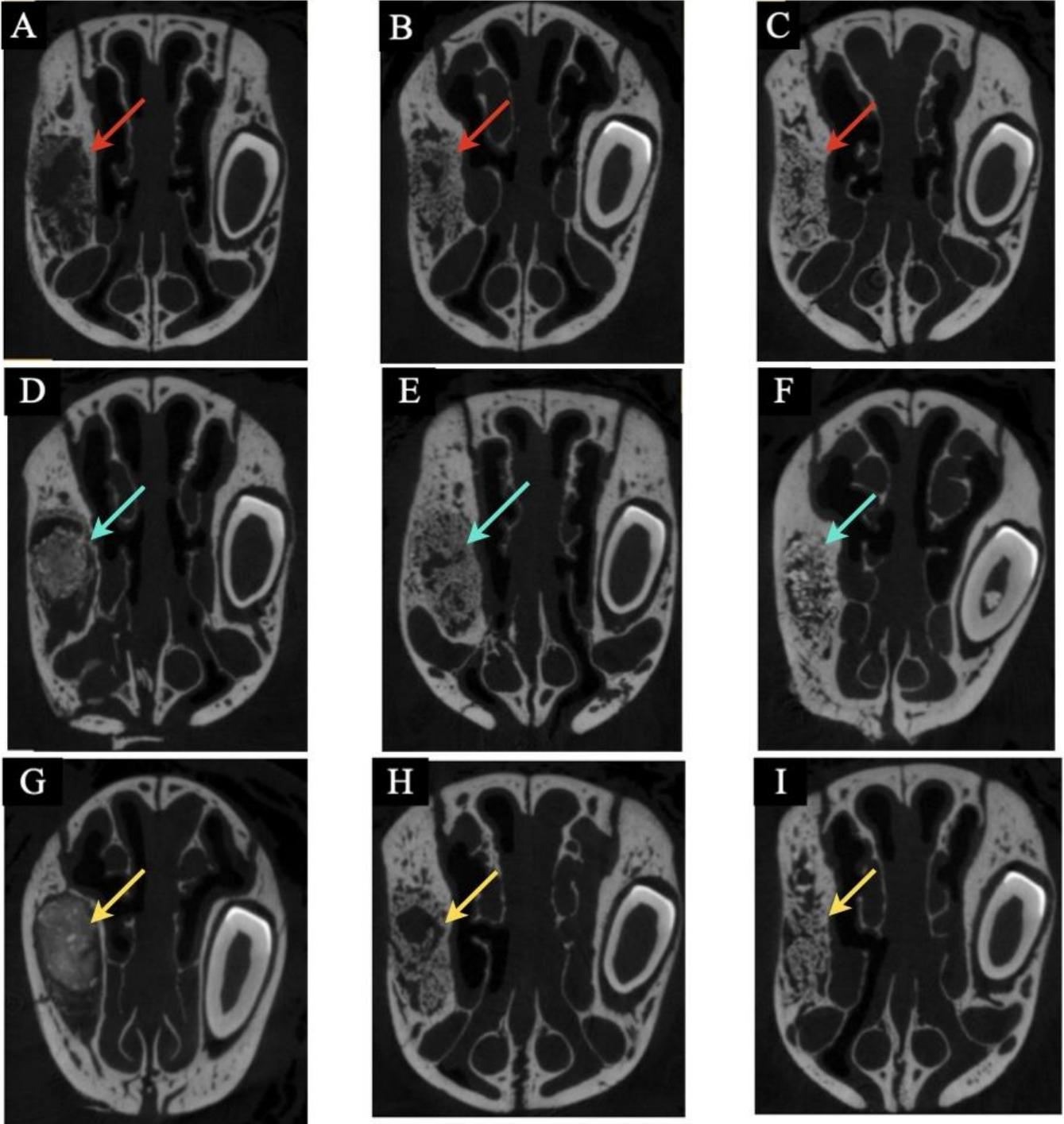


Figure 3: Photomicrographs of New Bone Formation and Inflammatory Infiltrate. Displayed at 20X magnification, these images illustrate the progression of new bone formation and the presence of inflammatory infiltrate within the dental alveoli over time at 7, 14, and 28 days post-extraction for the Control group (A-C), Bioglass F18 group (D-F), and β -Tricalcium Phosphate (β -TCP) group (G-I).

