

Charles Marin

**Avaliação histomorfométrica e teste de remoção ao
torque do implante dentário com superfície ossean®.
Estudo experimental em cães**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial.

Uberlândia, 2008

Charles Marin

**Avaliação histomorfométrica e teste de remoção ao
torque do implante dentário com superfície ossean®.
Estudo experimental em cães**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial.

Orientador: Prof. Dr. Darceny Zanetta-Barbosa

Banca Examinadora:
Prof. Dr. Darceny Zanetta-barbosa
Prof. Dr. José Nazareno Gil
Prof. Dr. Marcelo Beletti

Uberlândia
2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

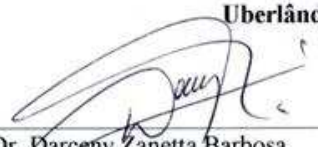
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

AV. Pará, 1720, bloco 2u – sala 2U09 – Campus Umuarama - UBERLÂNDIA –MG – 38400-902
(0XX) 034 –3218-2550

RELATÓRIO DA COMISSÃO JULGADORA DA PROVA DEFESA DE MESTRADO DO CD CHARLES MARIN, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DESTA UNIVERSIDADE.

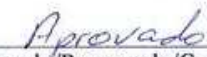
Às quinze horas do dia vinte e um de fevereiro do ano de dois mil e oito, reuniu-se a Comissão Julgadora indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação desta Faculdade, para o julgamento da Dissertação de Mestrado apresentada pelo candidato, CHARLES MARIN com o título: *Avaliação histomorfométrica e teste de remoção ao torque da superfície ossean® de implantes dentários. Estudo experimental em cães*. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador expressou o seu julgamento em sessão secreta e exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de Dissertações e Teses da Biblioteca desta Universidade. Acompanham este relatório os pareceres individuais dos membros da Comissão Julgadora.

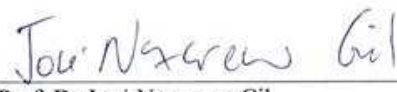
Uberlândia 21 de fevereiro de 2008

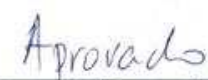

Prof. Dr. Darceny Zanetta Barbosa
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Uberlândia - UFU


Aprovado/Reprovado/Conceito


Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Uberlândia - UFU


Aprovado/Reprovado/Conceito


Prof. Dr. José Nazareno Gil
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Santa Catarina


Aprovado/Reprovado/Conceito

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família,
principalmente na figura de meus pais que juntos foram o pilar fundamental da
minha formação.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio incondicional em toda minha trajetória.

Ao Professor Dr. Darceny Zanetta-Barbosa pelo apoio as novas idéias e pela flexibilidade e tranquilidade na condução dos trabalhos acadêmicos.

Ao Professor Dr. José Nazareno Gil por abrir as portas da cirurgia Buco-Maxilo-Facial, ser o grande incentivador na carreira acadêmica e principalmente pela verdadeira amizade demonstrada nos últimos anos.

Ao Professor Dr. Paulo Guilherme Coelho pela confiança depositada na minha pessoa, pelo apoio incondicional prestado e pelas oportunidades oferecidas.

A meu amigo Rodrigo Granato parceiro incondicional nas empreitadas e peça fundamental para realização deste trabalho.

À Disciplina de Técnica Operatória da UFSC por disponibilizar a estrutura para a realização deste trabalho.

Ao Médico Veterinário Geraldo Bernardes Servegnini pelo apoio com os animais.

Aos colegas de mestrado pela convivência e a forma ímpar que me acolheram na cidade de Uberlândia.

Aos funcionários da UFU em especial a Cidinha e a Abigail pela indescritível eficiência e disposição em todas as horas.

SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	02
1 INTRODUÇÃO	03
2 REVISÃO DA LITERATURA	04
3 PROPOSIÇÃO	06
4 MATERIAIS E MÉTODOS	07
5 RESULTADOS.....	15
6 DISCUSSÃO	22
7 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS.....	29

Resumo

O objetivo deste estudo foi comparar a fixação biomecânica e o contato osso-implante (%COI) entre a superfície Ossean® obtida por jateamento com partículas biocerâmicas e ataque ácido e o grupo controle (C) de superfície tratada com duplo ataque ácido em cães beagle. Os implantes controle e Ossean® (n=3) foram submetidos a testes de caracterização físico/química de superfície, incluindo microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (MFA) e espectroscopia Auger (EA). O estudo animal compreendeu a colocação de 72 implantes na porção proximal da tíbia (36 por superfície, 6 por perna, bilateralmente) os quais permaneceram por 2 e 4 semanas in vivo. Após a eutanásia, metade dos espécimes foram destinados ao teste biomecânico (torque de remoção) e a outra metade foram processadas para obtenção de lâminas não descalcificadas de aproximadamente 30µm de espessura onde foram realizadas análises histomorfológica e histomorfométrica avaliando a %COI. O teste de Tukey para comparações múltiplas e o ANOVA com 95% de significância foram utilizados para análise estatística. A MEV e MFA mostraram que as microtexturas foram qualitativa e quantitativamente diferentes e que a superfície Ossean® apresenta maiores valores nanométricos de R_a e RMS comparados à superfície do grupo controle. Ca e P foram detectados na superfície Ossean® através da EA. Maior organização do tecido ósseo foi observadas ao longo do perímetro da superfície Ossean® em relação ao grupo controle apesar de não haver diferença estatística na %COI ($p > 0.16$). Os valores para o teste de remoção ao torque foram estatisticamente maiores para os implantes Ossean® em 2 e 4 semanas quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$). Os resultados biomecânicos e histomorfológicos sugerem que a fase inicial do reparo ósseo é afetada positivamente pela superfície Ossean® comparada à superfície com duplo ataque ácido.

Palavras chave: Osseointegração, Implantes Dentários, Biomecânica

Abstract

The objective of this study was to compare the biomechanical fixation and bone-to-implant contact (%BIC) between the Ossean™, a bioceramic grit-blasted and acid-etched surface versus a dual acid-etched implant surface (Control) in a beagle dog model. Control and Ossean™ implants (n=3) were subjected to a series of physico/chemical characterization tools including scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), and auger photoelectron spectroscopy (APS). The animal model comprised the placement of 72 implants along the proximal tibiae of 6 beagle dogs (36 per surface, 6 per limb, through bilateral sequenced procedures), which remained for 2 and 4 weeks implantation time. After euthanization, half the specimens were biomechanically tested (removal torque), and the other half was nondecalcified processed to ~30 µm thickness slides for histomorphologic and histomorphometric (%BIC) evaluation. ANOVA at 95% level of confidence and Tukey post-hoc test was utilized for multiple comparisons. The SEM and AFM showed that surface microtextures were qualitatively and quantitatively different, and that the Ossean™ surface presented higher submicrometer R_a and RMS values compared to Control surfaces. Ca and P was detected at the Ossean™ surface by APS. Higher degrees of bone organization were observed along the perimeter of the Ossean™ surface compared to Control, despite the non-significant differences in %BIC between surfaces ($p > 0.16$). Significantly higher removal torque was observed for the Ossean™ implants at both implantation times ($p < 0.0001$). According to the biomechanical and histomorphologic results, early wound healing was positively affected by the Ossean™ surface compared to the dual-acid etched surface.

Keywords: Osseointegration, Dental Implants, Biomechanics

1 Introdução

A odontologia sofreu profundas modificações com o avanço dos biomateriais, a possibilidade de instalação de raízes artificiais para posterior reposição de elementos dentais perdidos, seja por trauma ou por doenças, tornou-se realidade após o evento da osseointegração(1). Subsequentemente, um processo de difusão do conhecimento e a formação de vários grupos de pesquisa levaram a reavaliação dos protocolos de instalação e do tempo para a osseointegração classicamente propostos(2). Por muitos anos o sistema conhecido como Bränemark (implantes de superfície lisa) foi o mais utilizado na implantodontia e por consequência, o que sofreu o maior número de pesquisas, tanto experimentais quanto clínicas, com controles de longo prazo(3-7). Atualmente, outras marcas comerciais disponíveis apresentam trabalhos com mais de 5 anos bem documentados(8). Pela própria diversificação do mercado, o modelo tradicional dos implantes lisos foi aos poucos sendo substituído por implantes com tratamento de superfície e atualmente, todas as grandes companhias possuem implantes com tratamento de superfície(9). As alterações de superfície podem ser topográficas ou físico-químicas(8). As alterações topográficas são realizadas para aumentar a área de superfície criando microrugosidades, que pode ser obtidas por vários processos como jateamento com areia(10), anodização(11) e ataque ácido(12). As alterações químicas constituem-se basicamente no uso de biocerâmicas, a base de Ca e P, associadas a superfície de implantes(13, 14). Estas modificações receberam grande atenção nos últimos anos pela melhora na regeneração óssea ao redor de implantes endósseos(13, 15, 16). Existem poucos estudos com a deposição nanométrica de Ca e P na superfície de implantes, sendo necessário a investigação para futuro uso clínico. O objetivo deste trabalho é avaliar em cães a fixação biomecânica e o contato osso/implante (COI) entre a superfície Ossean® (Jateamento com biocerâmica absorvível, ataque ácido e limpeza seletiva) e a superfície convencional sem biocerâmica tratada com duplo ataque ácido.

2 Revisão da Literatura

A procura de materiais com maior compatibilidade para implantodontia na tentativa de melhorar/acelerar a resposta do hospedeiro tem recebido importante atenção nas últimas três décadas(1-15). Considerando que a superfície do implante é a primeira parte a interagir com o hospedeiro modulando a resposta tecidual e os eventos iniciais da regeneração, as superfícies dos implantes sofreram alterações profundas nos últimos 10 anos(2, 8, 17-20). Entre os parâmetros que são comumente investigados nas alterações de superfície se destacam: a rugosidade e as alterações químicas e ambas tem apresentado resultados promissores(8, 9).

Ra é a média de altura entre picos e vales e RMS (root mean square) é a raiz quadrada do quadrado da média de altura, mensurados a partir de uma superfície linear. Em função dos valores de altura serem elevados ao quadrado durante o cálculo de RMS, este é considerado mais sensível para picos e vales que a Ra, sendo um parâmetro mais apropriado para avaliar diferentes tipos de superfícies(21).

Comumente os valores de rugosidade (R_a) entre 0,5 e 2 μm , obtidos através de subtração ácida e/ou jateamento por partículas absorvíveis ou não absorvíveis, tem influenciado positivamente a resposta do tecido ósseo nos implantes endósseos quando comparados aos implantes lisos(8, 9). Butz et al. (2006)(22) demonstrou recentemente que as propriedades mecânicas do tecido ósseo próximo de um substrato rugoso são melhores quando comparadas aos implantes lisos nos eventos iniciais da regeneração óssea após a colocação do implante. Além disso, com o objetivo de melhorar a resposta do tecido ósseo, alterações químicas da superfície do implante foram recentemente adicionadas em implantes previamente tratados para obtenção de rugosidades entre 0.5 e 2.0 μm (12, 14, 18, 19, 23, 24).

Estudos clínicos realizados em animais e pesquisas básicas têm demonstrado que implantes com recobrimento cerâmico apresentam alto grau de osseocondução, resultando em altos níveis de fixação durante a fase inicial do processo de regeneração após a colocação dos implantes, quando

comparados aos implantes sem recobrimento(13, 14, 25-27). A maioria os implantes com recobrimento biocerâmico são produzidos com uma camada que varia de 20 até 50 µm de espessura por jateamento de plasma de hidroxiapatita (PSHA)(13, 15, 26-29). Os recobrimentos biocerâmicos normalmente são mantidos por embricamento mecânico entre as rugosidades da superfície metálica e a camada de biocerâmica durante a instalação e posteriormente, durante o período funcional do implante(13). Esta região específica que compreende o metal, a camada de óxido e o recobrimento biocerâmico é considerada uma união fraca e relatos de falha na união são descritos(13, 15, 26).

Na tentativa de melhorar a resposta biológica e ao mesmo tempo evitar os possíveis fracassos a longo prazo encontrados nos recobrimentos, PSHA tem-se empregado a deposição de finas camadas em substratos metálicos rugosos(28, 30), deposição cristalina discreta(31) e a incorporação de ions Ca e P através de jateamento com partículas absorvíveis, ataque ácido e procedimentos de limpeza seletiva(13, 15). A razão para a diminuição das camadas ou do tamanho das partículas de Ca e P tem sido utilizadas nas superfícies dos implantes para melhora da osseocondução nos estágios iniciais da regeneração óssea após a colocação do implante, como observados nos implantes tratados com recobrimento PSHA e ao mesmo tempo, evitar a presença da interface metalocerâmica por longos períodos até a dissolução completa do recobrimento ou a pouca presença de contato direto osso/implante(30).

Outras pesquisas sobre o tratamento de superfície utilizando biocerâmicas em escala micrométrica(14, 28) e nanométrica(24, 32) têm apresentado melhores resultados histomorfométricos (contato osso/implante(14, 24, 27), de osseatividade(32)) e biomecânicos nos períodos iniciais(14, 27, 32) e tardios(14, 28) após a instalação dos implantes, quando comparados com implantes sem aplicação de biocerâmica e comparáveis aos implantes tratados com recobrimento espesso de PSHA(20, 25, 28, 33). Alguns estudos abordam a união do tecido ósseo em substratos que contenham nanopartículas de Ca e P(31).

3 Proposição

Avaliar em cães a fixação biomecânica e o contato osso/implante (BIC) entre a superfície Ossean® (Jateamento com biocerâmica absorvível, ataque ácido e processo de limpeza seletiva) e a superfície convencional tratada com duplo ataque ácido.

4 Materiais e métodos

Os implantes utilizados (n=78) foram recebidos do fabricante (*Intra-Lock International, Boca Raton, USA*) apresentando superfície tratada com duplo ataque ácido para o grupo controle (C) (n=39) e a superfície Ossean® (OSS) (n=39) (Jateamento com biocerâmica absorvível e ataque ácido) para o grupo experimental. Os implantes tinham tamanho de 10mm de comprimento, 4mm diâmetro e hexágono interno.

4.1 Caracterização de Superfície

Três implantes do grupo controle (C) (n=3) e três implantes do grupo Ossean® (n=3) foram utilizados para análise das características físico/químicas da superfície do implante.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (*SEM, Philips XL 30, Eindhoven, The Netherlands*) foi realizada em vários graus de ampliação sob a voltagem de aceleração de 15 KV. A análise química da superfície foi realizada por Espectroscopia Auger (EA) (*EDAX®, Mahwah, NJ*) em vários locais da superfície sob várias voltagens de aceleração.

Os parâmetros de rugosidade de superfície (R_a e RMS) e as imagens tridimensionais foram coletadas com o auxílio de Microscopia de Força Atômica (MFA) em contato, utilizando um Nanoscópio IIIa Sistema Multimodo (*Digital Instruments, Santa Barbara, CA*). O escaneamento foi realizado com variação máxima horizontal de 125 μm e 5 μm vertical utilizando um braço de Si_3N_4 com 200 μm sob uma força constante de 0,12 N/m. A região analisada foi a parte plana da borda cortante do implante (áreas de 20x20 μm para evitar variação no eixo z). Três mensurações por implante foram realizadas.

Um PHI 670 Scanning Auger Microprobe equipado com um analisador tipo CMA foi utilizado para examinar as características químicas da superfície em várias regiões do implante. Após o exame um feixe de elétrons com voltagem de aceleração de 10 KV com angulação de 30° com a respectiva

amostra foi utilizado para marcar a superfície do implante por 2 minutos (marcação calibrada em 37 Å/min para uma amostra padrão de SiO₂).

4.2 Experimento Animal

Para o modelo animal, 36 implantes controle (n=36) e 36 implantes da superfície ossean® (n=36) foram utilizados. Seis cães beagles adultos com aproximadamente 1,5 ano de idade foram selecionados após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da Universidade Federal de Santa Catarina e foram divididos de acordo com o tempo *in vivo* após a inserção dos implantes (2 e 4 semanas).

4.3 Procedimento Cirúrgico

Previamente a anestesia geral foi realizada a aplicação de sulfato de atropina (0,044 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (8mg/Kg). Após o efeito inicial das primeiras drogas seguiu-se com a aplicação de Cloridrato de Ketamina (15mg/Kg) para se obter anestesia geral.

O local de eleição para a colocação dos implantes foi a porção proximal da tíbia, a qual foi inicialmente preparada com tricotomia e aplicação de solução antisséptica a base de iodo. Realizou-se uma incisão através da pele de aproximadamente 5 cm de comprimento até alcançar o periósteo em profundidade; com o auxílio de descoladores a elevação do periósteo foi realizada até a completa exposição do osso na porção medial da tíbia.

Perfurações padronizadas foram realizadas com brocas sequenciais (broca piloto, seguidas por 2,0mm, 2,5mm, 3,0mm e 3,5mm de diâmetro) (*Intra-Lock, Boca Ranton, USA*) em 1.200rpm sob abundante irrigação com soro fisiológico 0,9%. O primeiro implante foi posicionado 2cm abaixo da cápsula articular no centro da porção proximal e médio-lateral da tíbia. Os outros cinco implantes foram colocados na direção distal com 1 cm de distância entre os implantes na região central do osso utilizando catraca convencional específica do sistema (*Intra-Lock, Boca Ranton, USA*)(Figura 1).



Figura 1. Seqüência de perfurações prontas para colocação dos implantes, a perfuração inicial está localizada no extremo direito da figura.

Em cada tíbia 3 implantes do grupo experimental e 3 do grupo controle foram instalados de maneira intercalada afim de obter uma melhor qualidade de amostra nos tempos *in vivo* e local onde o implante foi instalado. Após a colocação dos implantes, os parafusos de cobertura foram instalados em cada implante (Figura 2). O periósteo foi suturado com vicryl® 4-0 (Ethicon Johnson, USA) e a pele com nylon 4-0(Shalon, Goiania, Brazil) (Figura. 3a,b).



Figura 2. Implantes instalados na tíbia com os parafusos de cobertura.

Após a cirurgia, antibiótico e antiinflamatório foram administrados consistindo em dose única de Penicilina Benzatina (20.000 UI/Kg) IM e cetoprofeno 1% (1ml/5Kg). Os animais foram mantidos em 2 baias em grupos de 3 cães com comida e água à vontade nos dias que se seguiram até a eutanásia. Os animais foram sacrificados 2 e 4 semanas após o procedimento cirúrgico, por overdose anestésica, com as mesmas medicações citadas anteriormente. Com o auxílio de serra manual, o terço superior da tíbia foi removido e realizada a dissecação para remoção de todo o tecido mole adjacente.



Figura 3. Fechamento do acesso cirúrgico do periósteo (a) e pele (b).

Metade dos espécimes obtidos foram destinados ao teste mecânico e a outra metade sofreram processamento sem descalcificação para avaliação histomorfológica e histomorfométrica.

Para o teste de remoção ao torque, a tíbia com os implantes foi adaptada à máquina eletrônica de torque equipada com célula de carga de 2000 Ncm (Test Resources, Minneapolis, MN). Adaptou-se uma peça específica ao hexágono interno de cada implante e o bloco foi cuidadosamente posicionado para evitar desalinhamento durante a realização do teste (Figura 4).

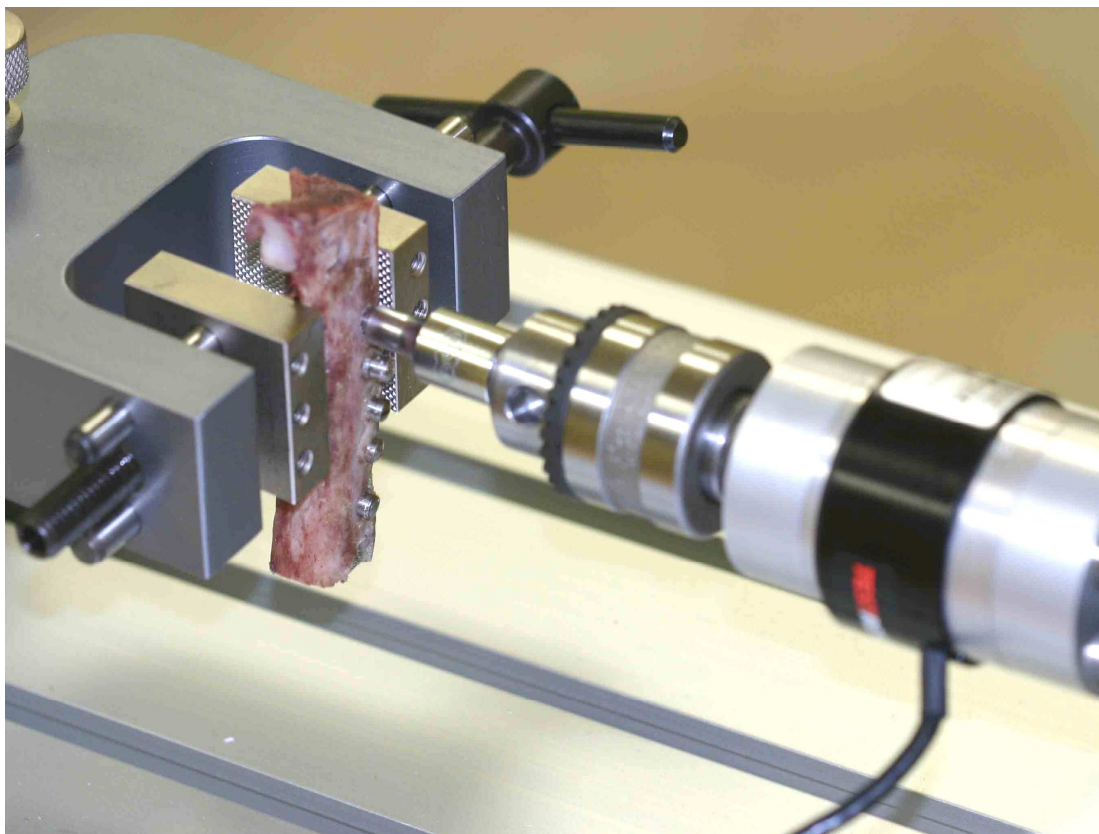


Figura 4. Peça com os implantes posicionada na máquina de torque, observe a correta angulação no momento da realização do teste.

Os implantes sofreram torque de remoção no sentido anti-horário na razão de aproximadamente $\sim 0,196$ rad/min e uma curva de torque/deslocamento foi registrada para cada espécime. Valores de torque abaixo de 20 Ncm foram considerados falhas e excluídos da análise estatística.

Os implantes restantes foram divididos em blocos contendo um implante cada e mantidos em solução tamponada de formalina 10% por 24h, lavadas em água corrente por 24h e gradualmente desidratadas seriadamente em soluções acoólicas de 70-100% de etanol. Após a desidratação, as amostras foram embebidas em resina a base de metacrilato (*Technovit 9100, Kultzer & Co, Wehrhein, Germany*) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a polimerização sob baixa temperatura (Figura 5 a,b), os blocos foram seccionados no longo eixo do implante e perpendicular a cortical externa da tíbia com o auxílio de uma serra diamantada de precisão (*Isomet 2000, Buehler, Germany*) (Figura 6). Após o corte uma das partes, foi colada

em placas de acrílico utilizando cola a base de acrilato e deixado polimerizar por 24h antes do desgaste e polimento. As amostras foram reduzidas até a espessura final de aproximadamente 30µm através de uma seqüência seriada de lixas a base de SiC (400, 600, 800, 1200 e 2400) (*Buehler, Germany*) em máquina de polimento (*Metaserv 3000, Buehler, Germany*) sob abundante irrigação com água corrente (Figura 7a, b).

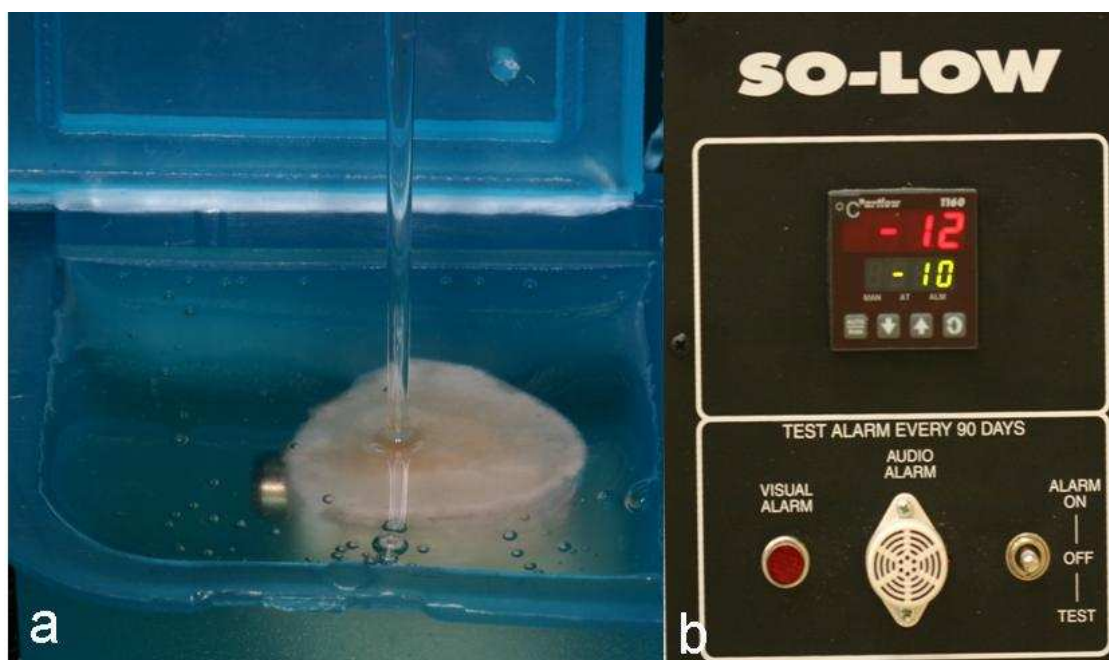


Figura 5. Inclusão dos espécimes em resina (a), Acondicionamento para polimerização em baixa temperatura (b).

As imagens utilizadas para as avaliações histomorfológicas e de contato osso/implante foram obtidas através de microscopia óptica com ampliação de 100x (*Leica Microsystems, Switzerland*). As imagens foram adquiridas em todo o perímetro do implante através de câmera digital acoplada ao microscópio (*Leica Microsystems, Switzerland*). Esta seqüência de imagens obtidas de cada implante foram agrupadas com o auxílio de software específico (*Photoshop Elements 5.0, Adobe System Incorporated, USA*), gerando uma imagem única que engloba toda a superfície do implante juntamente com o tecido ósseo adjacente. As mensurações da porcentagem de contato osso/implante foram realizadas nas imagens geradas anteriormente em outro software (*Leica Microsystems, Switzerland*).

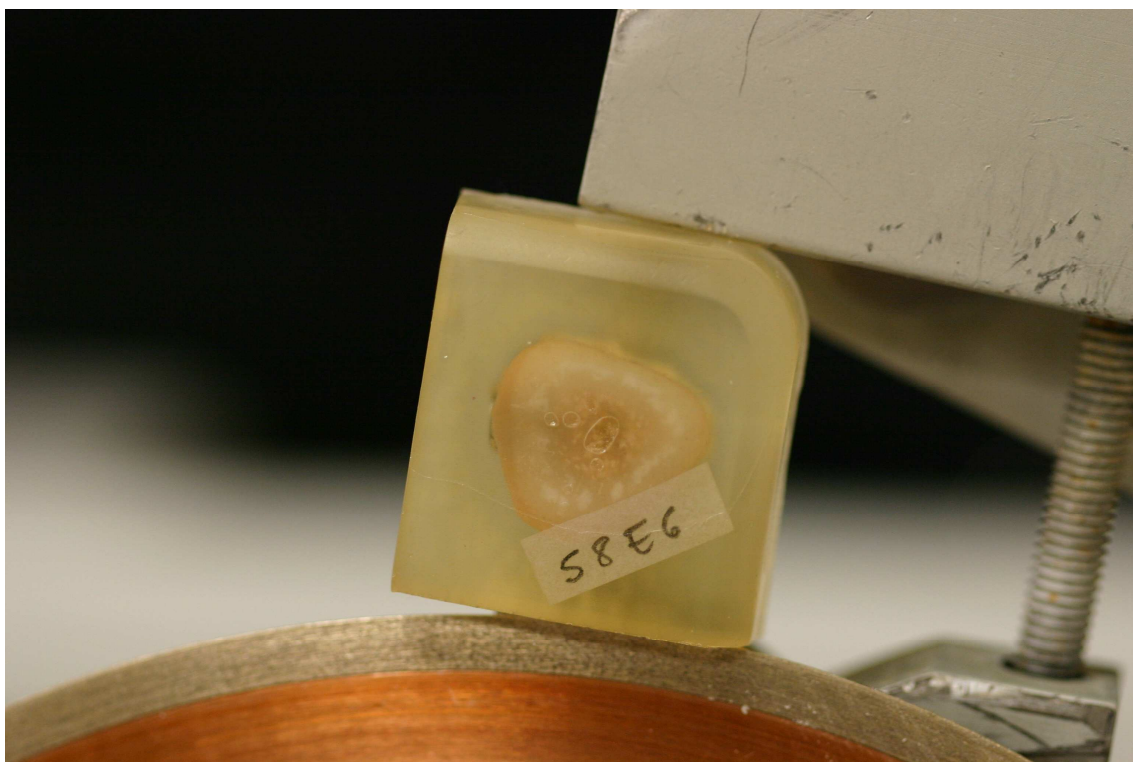


Figura 6. Máquina de corte para secção dos espécimes

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste ANOVA fator único com 95% de nível de significância e o teste de tukey foi utilizado para comparações múltiplas.

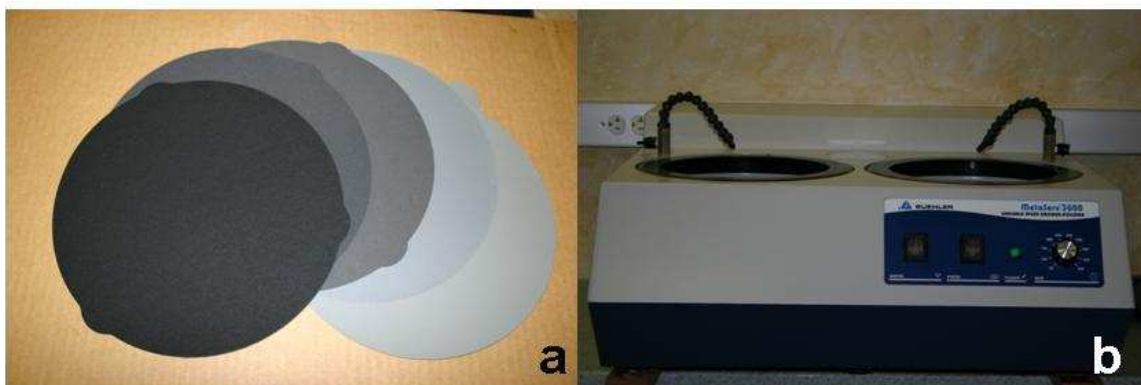


Figura 7. Lixas sequenciais com diferentes granulações (a), máquina de polimento (b).

5 Resultados

5.1 Caracterização de Superfície

A eletromicrografia e a microscopia de força atômica das superfícies do grupo controle e do grupo Ossean® estão representadas na figura 8. A topografia nanométrica do grupo Ossean® apresentou maiores valores de R_a e RMS comparados com o grupo controle (Gráfico 1). A análise de grandes áreas que determinam os níveis micrométricos da rugosidade de superfície são usualmente utilizados para os implantes dentais(8, 9) a avaliação foi diminuída pelo eixo z MFA a 5 μm (a MFA poderia perder o contato ou alcançar a diferença máxima durante as diferentes leituras) e apenas pequenas áreas poderiam ser utilizadas para determinar as características submicrométricas das duas superfícies.

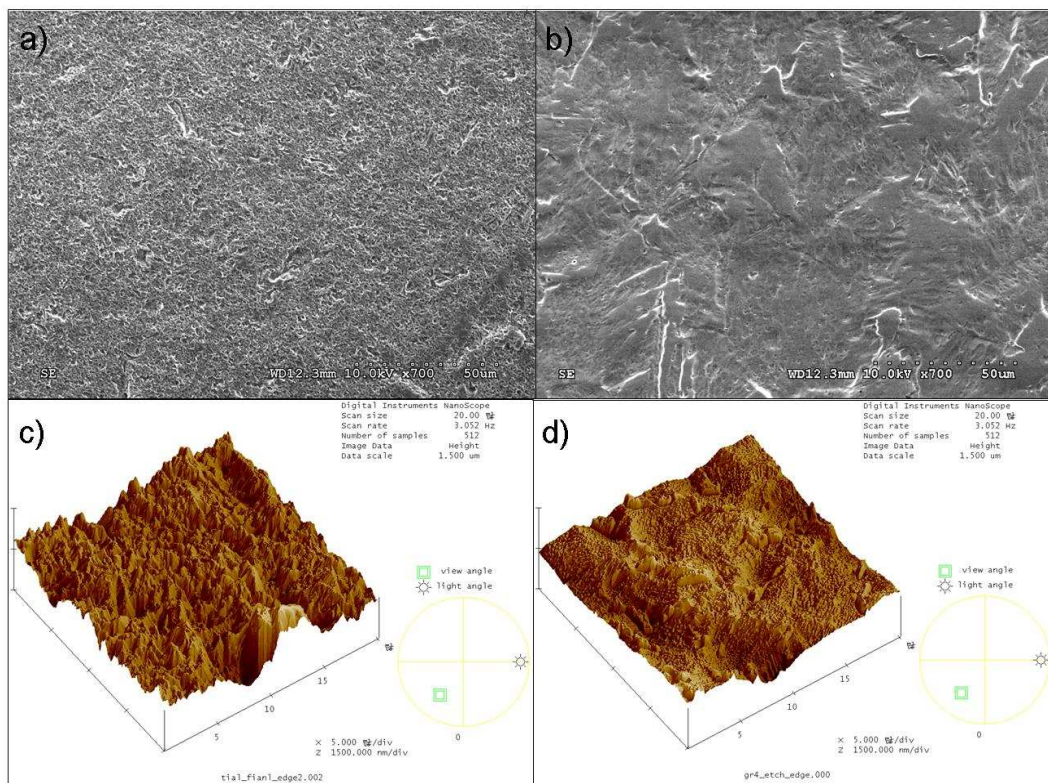


Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura mostrando a microtopografia de superfície (a) Ossean e (b) Control (duplo ataque ácido). A área 3D de 20x20 μm da MFA apresentando rugosidade em escala nanométrica para as superfícies (c) Ossean e (d) Controle.

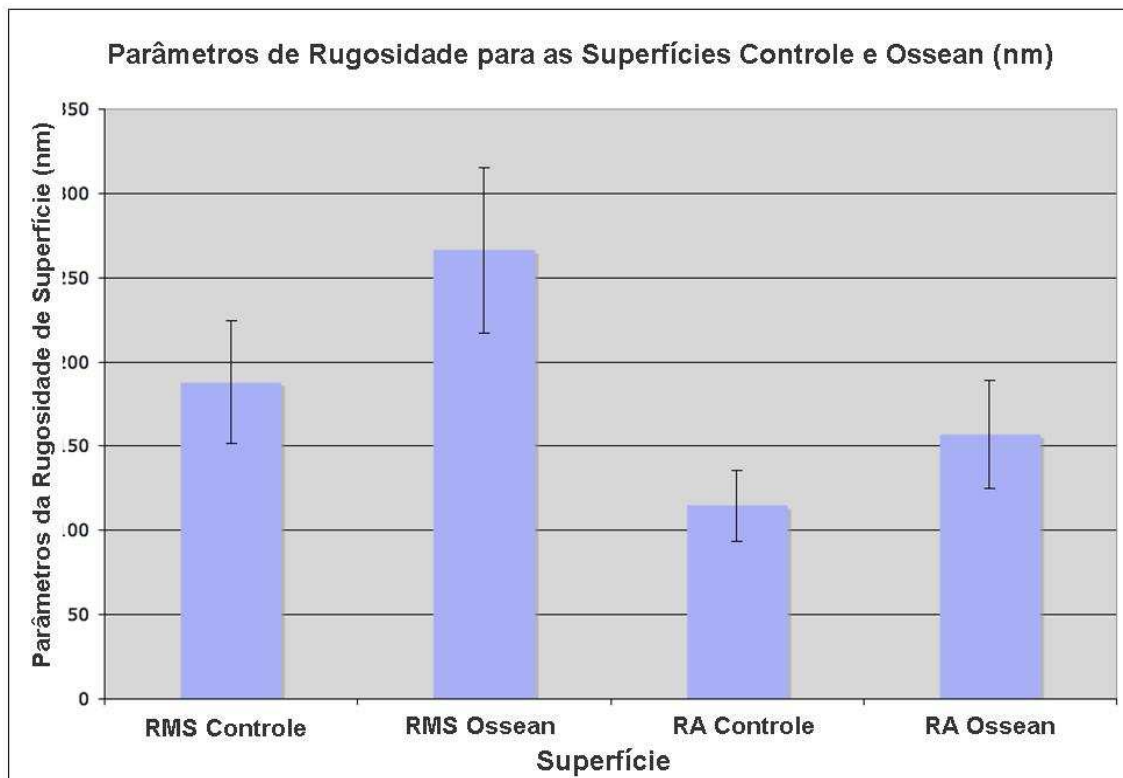


Gráfico 1: Resumo estatístico dos parâmetros de rugosidade Ra e RMS para as superfícies Ossean e Controle. Há diferença estatisticamente significativa entre os valores de Ra e RMS para as superfícies Ossean e Controle.

A espectroscopia revelou a presença de O, C, Ca, P e Ti em vários pontos antes e depois da marcação pelo feixe iônico (Fig. 10). Os mesmos componentes com excessão de Ca e P foram detectados na superfície do implante controle.

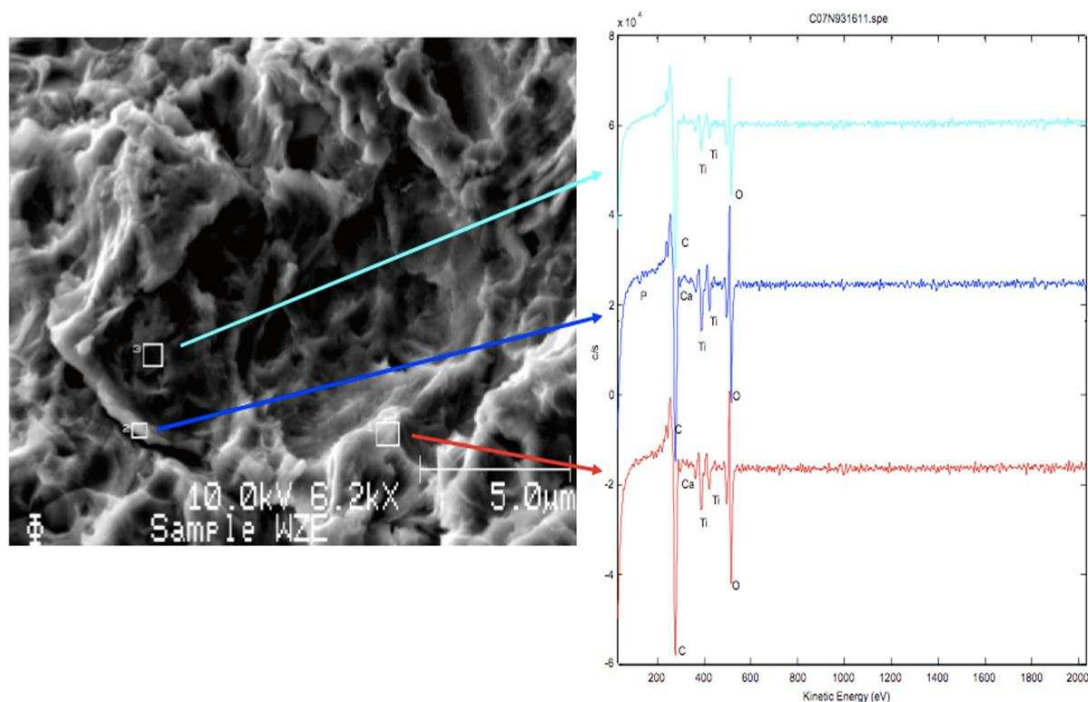


Figura 10: Presença de O, C, Ca, P e Ti em vários pontos da superfície antes e após a aplicação do feixe iônico.

5.2 Experimento Animal

Os procedimentos cirúrgicos e o período pós-operatório seguiram-se livre de complicações sem sinais de infecção ou outras intercorrências relevantes. Após a eutanásia os implantes foram inspecionados manualmente e devido à boa estabilidade todos os implantes foram destinados para os testes de torque e histomorfometria. Entretanto os valores de torque observados para 3 implantes foram abaixo de 15 Ncm e estes foram excluídos do estudo (todos do grupo de 4 semanas, 2 da superfície Controle e 1 da superfície Ossean®).

O teste ANOVA de fator único mostrou significativamente valores de torque de remoção mais altos para o grupo Ossean quando comparados ao grupo controle ($p < 0.0001$) (Gráfico 2)

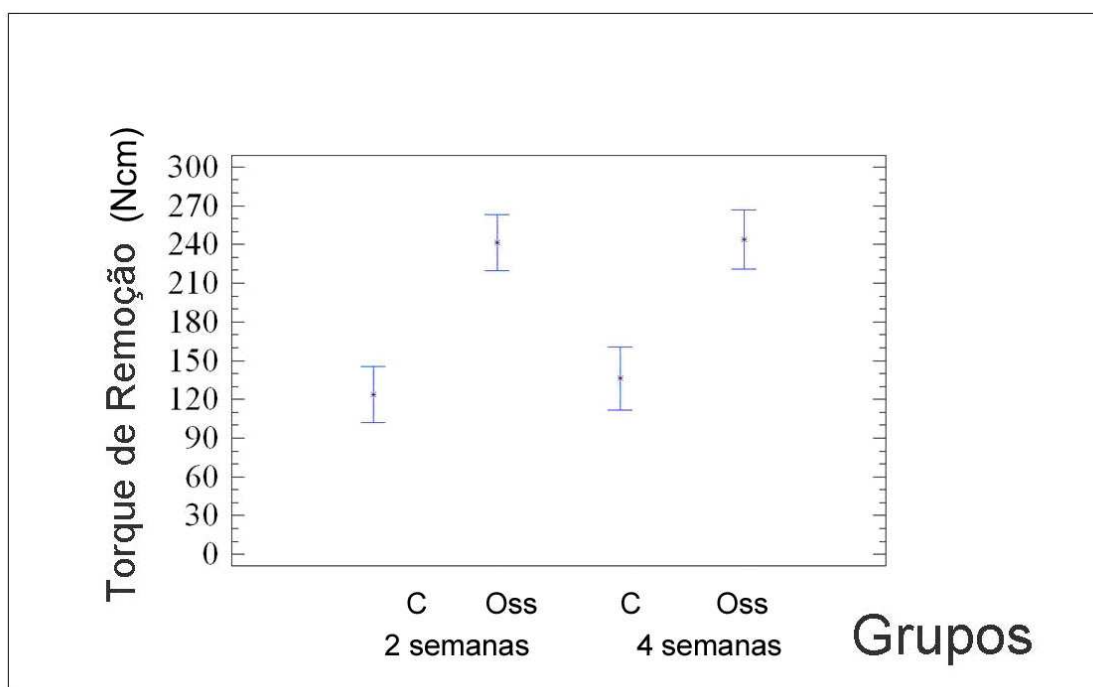


Gráfico 2: Valores da remoção ao torque (Ncm) para os grupos Controle (C) e Ossean (Oss) para 2 e 4 semanas. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.0001$) para 2 e 4 semanas.

De maneira geral a resposta do tecido ósseo apresentou íntimo contato do implante com as porções cortical e medular, apoiando as propriedades de biocompatibilidade e osseointegração (figura 11). Foi observado a regeneração do tipo aposicional através do perímetro do implante, onde há contato direto entre o osso e o implante durante a instalação(2, 34). Embora a regeneração aposicional de osso tenha sido observada em ambos os grupos, diferenças de reparo são observadas nas diferentes superfícies estudadas nos diferentes tempos após o procedimento cirúrgico (figura 12a-d).

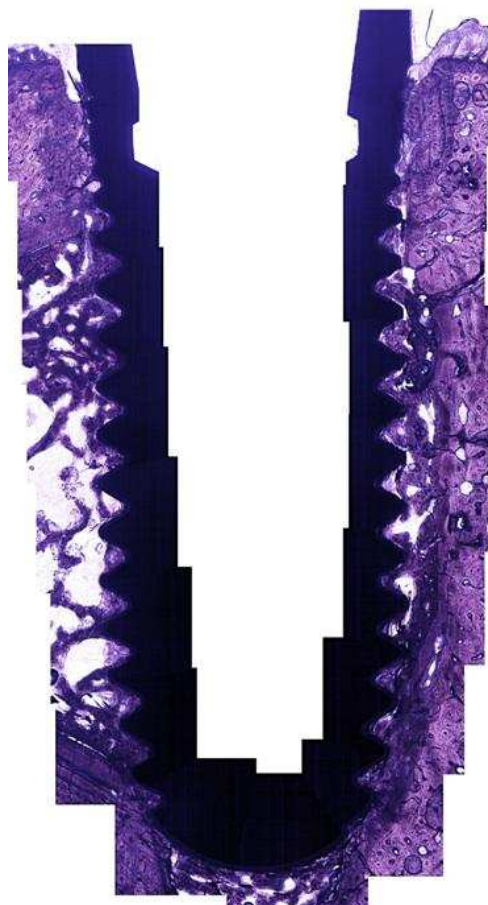


Figura 11: Implante instalado na tíbia do cão. Observações gerais mostram alto grau de contato osso implante em todo o perímetro do implante nas regiões cortical e medular.

Para o grupo controle de 2 semanas o implante estava circundado de osso imaturo em todo o perímetro (Fig 12a). Em 4 semanas houve um aumento qualitativo na quantidade de osso neoformado imaturo junto ao implante do grupo controle (Fig. 12b). Sinais iniciais de remodelação foram observados em alguns espécimes e uma pequena quantidade de osso lamelar foi observada próxima da interface osso/implante. No grupo Ossean® de 2 semanas, uma mistura de osso imaturo e osso lamelar foi facilmente identificada próximo a superfície do implante (Fig. 12c). Comparado ao controle de 4 semanas o grupo Ossean de 2 semanas apresentou maior grau de organização e osso lamelar. Com 4 semanas o grupo Ossean® teve a superfície preenchida com osso lamelar e presença de vários locais de

remodelação (fig 12d). Uma melhora qualitativa da quantidade de osso circundando a superfície Ossean® é observada quando comparada com a superfície Ossean® de 2 semanas (Fig. 12c-d).

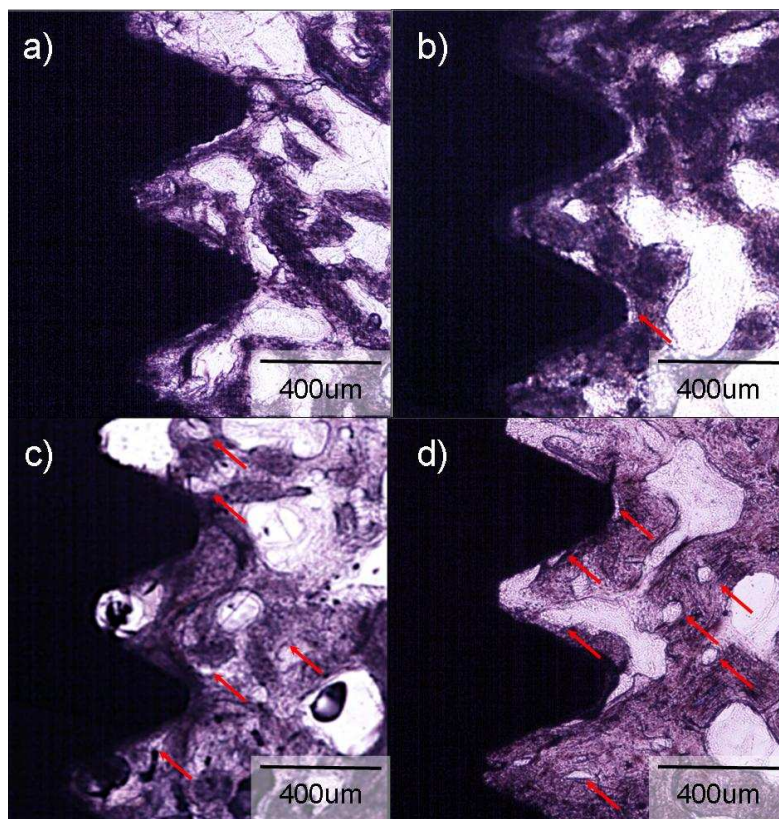


Figura 12: Microscopia óptica mostrando a interface osso/implante nos grupos (a) Controle 2 semanas, (b) Controle 4 semanas, (c) Ossean 2 semanas e (d) Ossean 4 semanas. Melhor organização do tecido ósseo observada no grupo Ossean em 2 e 4 semanas. As setas indicam locais de remodelagem (ampliação 100x) .

A análise estatística pelo teste ANOVA fator único não apresentou diferença significativa entre todos os grupos ($p > 0.25$) (Gráfico 3). Para os grupos controle e Ossean® um pequeno decréscimo na porcentagem de contato osso/implante foi observado em 4 semanas (Gráfico 3).

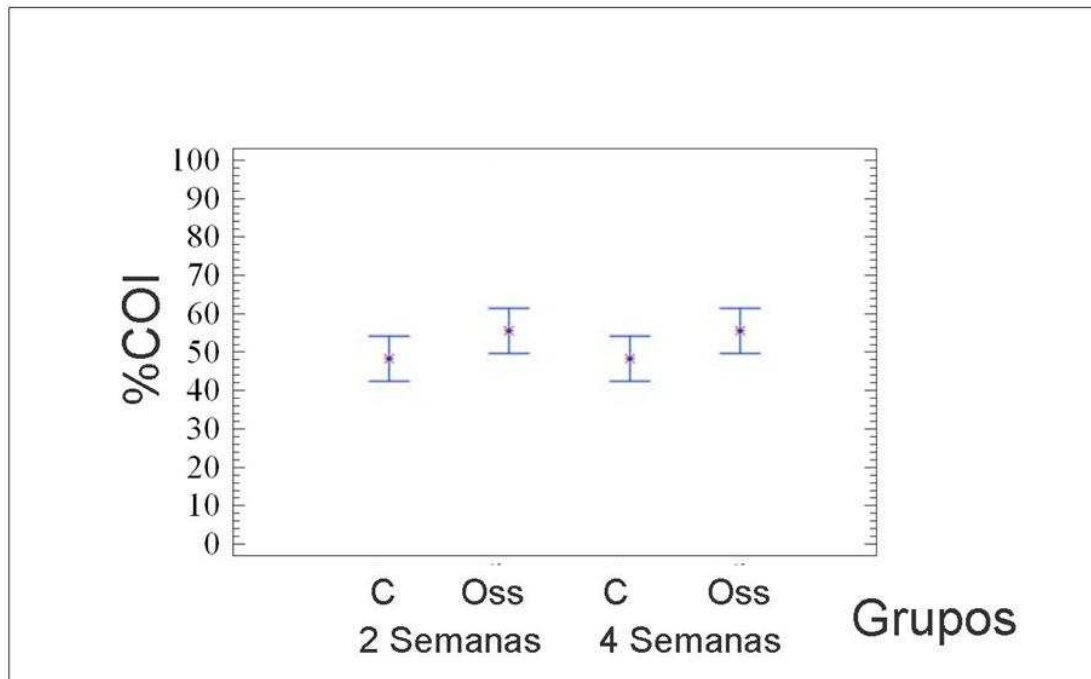


Gráfico 3: Valores do contato osso/implante (%COI) para os grupos Controle (C) e Ossean (Oss) para 2 e 4 semanas. Não há diferença estatisticamente significativa ($p > 0.25$) para 2 e 4 semanas.

6 Discussão

Osseointegração tem sido definida como o íntimo contato entre osso e os biomateriais observado sob microscopia óptica, (8, 9) o sucesso dos implantes na reabilitação bucal está estabelecido em estudos à longo prazo de acompanhamento com índices de sucesso acima de 90% com o uso de implantes lisos(5, 35). Nas últimas duas décadas tem-se dado grande importância para a melhora da resposta óssea frente às alterações do macro e micro desenho do implante. Dentre estas alterações, as alterações de superfície têm sido as mais estudadas, considerando que esta é a porção do implante que primeiramente interage com o tecido ósseo, tendo o potencial de melhorar a resposta tecidual a curto e longo prazo entre osso/implante.(12, 19, 30, 34, 36)

Pesquisas anteriores têm mostrado que o aumento da microtopografia através de uma variedade de processos industriais (tipicamente apresentando R_a variando entre 0.5 to 2 μm (8, 9)) tem resultado na melhora da resposta óssea e no embridamento osso/implante comparado com os implantes lisos. (2, 8, 9) É proposto que o aumento das propriedades mecânicas dos implantes com superfície rugosa em relação as superfícies lisas é devido ao embridamento mecânico entre o osso e a superfície. Um estudo utilizando nanoidentação demonstrou que a microtexturização da superfície (superfície com duplo ataque ácido, R_a variando de 0.5 à 1.0 μm (8, 9)) resulta em melhores propriedades mecânicas quando comparadas à implantes de superfície lisa (R_a também variando de 0.5 à 1 μm (8, 9)) nas etapas iniciais após a instalação do implante.(22) Também tem sido proposto que a texturização de superfície em escala nanométrica altera significativamente a resposta osso/implante, podendo proporcionar adesão do osso ao substrato do implante.(12)

De acordo com a literatura, as superfícies com duplo ataque ácido e a Ossean® usualmente melhoram a rugosidade micrométrica que varia de $R_a = 0.5$ à 2 μm , que conhecidamente apresenta melhor desempenho que os implantes lisos. (8, 9) Entretanto, além da usual diferença micrométrica na

rugosidade entre as superfícies tratadas por jateamento e ataque ácido, do ponto de vista de textura submicrométrica, os dados colhidos pela MEV e MFA detectaram diferenças qualitativas e quantitativas na morfologia da rugosidade de superfície (figura 9). Altos valores de R_a e RMS foram observados para a superfície Ossean® em nível submicrométrico (Gráfico 1), mesmo apresentando uma rugosidade similar à implantes lisos, uma observação cuidadosa deve ser dispensada para a MFA do grupo controle que, em escala nanométrica, apresenta texturização qualitativamente adequada (figura 9), comparada com a superfície Ossean®. Teoricamente a interação inicial da célula e dos biofluidos com a superfície podem ser substancialmente diferentes e terem um impacto positivo nas fases iniciais do reparo e na fixação biomecânica dos grupos controle e Ossean®.

A EA mostrou a incorporação de Ca e P na superfície do implante Ossean® resultante do JPA, ataque ácido e procedimentos de limpeza. Pesquisas anteriores consideraram que as quantidades disponíveis de Ca e P deveriam estar disponíveis através de camadas e graus variáveis de dissolução para resultar em melhora da resposta óssea através de recobrimentos espessos (11, 37). Nos últimos 5 anos estudos sugerem que quantidades substancialmente menores de Ca e P resultam em melhora da resposta óssea. (27, 31, 38-40)

Na tibia do cão a seqüência para colocação dos implantes utilizada resultou na comparação da mesma quantidade de implantes dos grupos controle e Ossean® por animal, sítio cirúrgico e tempo em vivo para os testes de histomorfometria e biomecânica. Este procedimento foi utilizado para minimizar o erro de análise devido as diferentes quantidades de osso medular e cortical presentes da porção proximal até a porção distal da tibia. A tibia do cão beagle permite a análise histológica da interação entre osso medular e cortical em relação à superfície do implante para os grupos controle e Ossean® (Figura 12), o que se constitui em vantagens sobre outros modelos animais onde as análises histomorfométricas e os testes biomecânicos têm sido restritos ao osso cortical. (19, 34) A análise do comportamento das diferentes superfícies é desejável em estudos animais, especialmente porque o uso

clínico de implantes em regiões de baixa densidade óssea necessitam maior tempo para obtenção de osseointegração. (3)

Os resultados histomorfológicos apresentados neste trabalho mostraram que o reparo por aposição óssea ocorreu por todo o perímetro do implante, observado em todos os grupos(34). Um íntimo contato entre o osso/implante foi observada nas regiões cortical e medular 2 e 4 semanas após a instalação dos implantes (Figura 11). Estes resultados apóiam que as duas superfícies testadas são biocompatíveis e osseocondutivas.(1, 3, 4, 9, 34) Entretanto, enquanto altos níveis de %COI foram observados para as duas superfícies testadas em 2 e 4 semanas após a colocação dos implantes (possivelmente devido a proximidade da superfície do implante ao endósseo no osso trabecular, resultado do tamanho do animal), um maior grau de organização foi observado ao longo do perímetro da superfície do implante Ossean® comparado ao grupo controle (Figura 12). A melhor organização do tecido ósseo próximo à superfície do implante Ossean® está de acordo com os resultados obtidos no teste biomecânico (Gráfico 1), considerando que as propriedades mecânicas melhorem com a evolução do processo de remodelação óssea. (41)

Somado ao aumento da microtextura observada para a superfície Ossean® comparada ao grupo controle, suas propriedades químicas de superfície (pequenas quantidades de Ca e P) podem também ter desempenhado um papel na resposta tecidual óssea. Esta hipótese é apoiada pois o recobrimento de implante à base de Ca e P, como o PSHA, possuem capacidade de melhorar a resposta óssea nos estágio iniciais do reparo(42) e pesquisas recentes com recobrimentos em escala nanométrica(30, 41) e deposição discreta de nanocristais(24, 31) têm apresentado melhoras significativas na resposta óssea nos implantes. Portanto, a mínima quantidade e a distribuição ideal necessárias para a melhora da resposta óssea ainda estão sendo determinadas.

Confirmando os resultados do presente estudo, outras pesquisas sobre finos recobrimentos ou deposição discreta têm utilizado implantes rugosos (jateados com ataque ácido ou duplo ataque ácido) como controle(24,

31). Considerando que há um consenso onde rugosidade variando entre $R_a = 0.5$ à $2 \mu\text{m}$ significa melhor resposta tecidual óssea quando comparada aos implantes lisos, pequenas modificações na textura submicrométrica e na química de superfície (como as apresentadas neste estudo), podem ainda modular positivamente o processo de reparo.

Apesar dos resultados histomorfométricos qualitativamente melhores e dos testes biomecânicos superiores com relação à superfície Ossean®, a determinação de qual característica desta superfície (textura ou química de superfície) levou à resultados favoráveis não é possível. Assim, futuros estudos de superfícies com microtexturas similares obtidas pelo processo Ossean® (presença de Ca e P na superfície) e processos alternativos (sem a presença de Ca e P na superfície) são desejáveis para determinar os efeitos potenciais da química de superfície nos estágios iniciais do reparo ósseo após a instalação de implantes endósseos.

7 Conclusão

Os resultados biomecânicos e a avaliação histomorfométrica apresentados neste estudo sugerem que a resposta óssea é afetada positivamente com o uso de partículas biocerâmicas absorvíveis em escala nanométrica.

Lista de figuras:

- 1 – Seqüência de perfurações prontas para colocação dos implantes, a perfuração inicial está localizada no extremo direito da figura.
- 2 – Implantes instalados na tíbia com os parafusos de cobertura.
- 3a,b – Fechamento do acesso cirúrgico do periósteo (a) e pele (b).
- 4 – Peça com os implantes posicionada na máquina de torque, observe a correta angulação no momento da realização do teste.
- 5 – Embutimento dos espécimes em resina (a), Acondicionamento para polimerização em baixa temperatura (b).
- 6 - Máquina de corte para secção dos espécimes
- 7 - Lixas sequenciais com diferentes granulações (a), máquina de polimento (b).
- 8 – Microcopia eletrônica de varredura mostrando a microtopografia de superfície (a) Ossean e (b) Control (duplo ataque ácido). A área 3D de 20x20um da MFA apresentando rugosidade em escala nanométrica para o (c) Ossean e (d) Controle
- 9 – Presença de O, C, Ca, P e Ti em vários pontos da superfície antes e após a aplicação do feixe iônico.
- 10 - Implante instalado na tíbia do cão observações gerais mostram alto grau de contato osso implante em toda o perímetro do implante nas regiões cortical e medual (magnificação 100x).
- 11 - Microscopia óptica mostrando a interface oss/implante nos grupos (a) Controle 2 semanas, (b) Controle 4 semanas, (c) Ossean 2 semanas e (d) Ossean 4 semanas. Melhor organização do tecido ósseo observada no grupo Ossean em 2 e 4 semanas. As setas indicam locais de remodelamento.

Gráficos:

1 - Resumo estatístico dos parâmetros de rugosidade Ra e RMS para as superfícies Ossean e Controle. Há diferença estatisticamente significativa entre os valores de Ra e RMS para as superfícies Ossean e Controle.

2 – Valores da remoção ao torque (Ncm) para os grupos Controle (C) e Ossean (Oss) para 2 e 4 semanas. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.0001$) para 2 e 4 semanas.

3 - Valores do contato osso/implante (%COI) para os grupos Controle (C) e Ossean (Oss) para 2 e 4 semanas. Não há diferença estatisticamente significativa ($p > 0.25$) para 2 e 4 semanas.

Referências

1. Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969;3(2):81-100.
2. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981;52(2):155-70.
3. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1986 Summer;1(1):11-25.
4. Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent*. 1983 Sep;50(3):399-410.
5. Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1977;16:1-132.
6. van Steenberghe D, Lekholm U, Bolender C, Folmer T, Henry P, Herrmann I, et al. Applicability of osseointegrated oral implants in the rehabilitation of partial edentulism: a prospective multicenter study on 558 fixtures. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1990 Fall;5(3):272-81.
7. Henry PJ, Laney WR, Jemt T, Harris D, Krogh PH, Polizzi G, et al. Osseointegrated implants for single-tooth replacement: a prospective 5-year multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996 Jul-Aug;11(4):450-5.
8. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont*. 2004 Sep-Oct;17(5):536-43.
9. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont*. 2004 Sep-Oct;17(5):544-64.
10. Yamagami A, Yoshihara Y, Suwa F. Mechanical and histologic examination of titanium alloy material treated by sandblasting and anodic oxidization. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 Jan-Feb;20(1):48-53.
11. Xiropaidis AV, Qahash M, Lim WH, Shanaman RH, Rohrer MD, Wikesjo UM, et al. Bone-implant contact at calcium phosphate-coated and porous titanium oxide (TiUnite)-modified oral implants. *Clin Oral Implants Res*. 2005 Oct;16(5):532-9.
12. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials*. 2007 Aug 11.
13. Lacefield WR. Current status of ceramic coatings for dental implants. *Implant Dent*. 1998;7(4):315-22.
14. Park YS, Yi KY, Lee IS, Han CH, Jung YC. The effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the grit-blasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 Jan-Feb;20(1):31-8.
15. Lacefield WR. Hydroxyapatite coatings. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;523:72-80.
16. Coelho PG, Lemons JE. IBAD Nanothick Bioceramic Incorporation on Metallic Implants for Bone Healing Enhancement. From Physico/Chemical Characterization to In-vivo Performance Evaluation. . In: ISBN, editor. *Nanotech 2005*; 2005; Anaheim, CA; 2005. p. 316-9.

17. Abrahamsson I, Berglundh T, Linder E, Lang NP, Lindhe J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Aug;15(4):381-92.
18. Berglundh T, Abrahamsson I, Albouy JP, Lindhe J. Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Apr;18(2):147-52.
19. Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res.* 2004 Jul;83(7):529-33.
20. Lemons JE. Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants. *J Oral Implantol.* 2004;30(5):318-24.
21. Klokkevold PR, Johnson P, Dadgostari S, Caputo A, Davies JE, Nishimura RD. Early endosseous integration enhanced by dual acid etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res.* 2001 Aug;12(4):350-7.
22. Butz F, Aita H, Wang CJ, Ogawa T. Harder and stiffer bone osseointegrated to roughened titanium. *J Dent Res.* 2006 Jun;85(6):560-5.
23. Coelho PG, Freire JNO, Coelho AL, Rubinger C, Silva NRF, Bottino MC, et al. Nanothickness Bioceramic Coatings: Improving the Host Response to Surgical Implants. In: Liepsch D, editor. 5th World Congress of Biomechanics; 2006; Munich, Germany: Medimont; 2006. p. 253-8.
24. Orsini G, Piatelli M, Scarano A, Petrone G, Kenealy J, Piatelli A, et al. Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *J Periodontol.* 2006;77(12):1984-90.
25. deGroot K KC, Wolke JGC, deBieck-Hogervorst JM,. Plasma-sprayed coating of calcium phosphate. In: Yamamuro T HL, Wilson J editor. Handbook of Bioactive ceramics, vol II, Calcium phosphate and Hydroxyapatite ceramics. Boca Raton: CRC Press; 1990. p. 17-25.
26. Kay J. Calcium Phosphate Coatings for Dental Implants. *Dental Clinics of North America.* 1992;36:1-18.
27. Ong JL, Carnes DL, Bessho K. Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. *Biomaterials.* 2004 Aug;25(19):4601-6.
28. Yang Y, Kim KH, Ong JL. A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process--an alternative to plasma spraying. *Biomaterials.* 2005 Jan;26(3):327-37.
29. Lemons J, Dietrich-Misch F. Biomaterials for Dental Implants. In: CE M, editor. Contemporary Implant Dentistry. Saint Louis: Mosby, Inc; 1999. p. 271-302.
30. Coelho P, Freire J, Coelho A, Rubinger C, Silva N, Bottino M, et al. Nanothickness Bioceramic Coatings: Improving the Host Response to Surgical Implants. In: Liepsch D, editor. 5th World Congress of Biomechanics; 2006; Munich, Germany: Medimont; 2006. p. 253-8.
31. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials.* 2007 Nov;28(32):4748-55.

- 32.Coelho P.G., Suzuki M. Evaluation of an IBAD thin-film process as an alternative method for surface incorporation of bioceramics on dental implants. A study in dogs. J Appl Oral Science. 2005;13(1):87-92.
- 33.Burgess AV, Story BJ, Wagner WR, Trisi P, Pikos MA, Guttenberg SA. Highly crystalline MP-1 hydroxylapatite coating. Part II: In vivo performance on endosseous root implants in dogs. Clin Oral Implants Res. 1999 Aug;10(4):257-66.
- 34.Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. Clin Oral Implants Res. 2003 Jun;14(3):251-62.
- 35.Jemt T, Chai J, Harnett J, Heath MR, Hutton JE, Johns RB, et al. A 5-year prospective multicenter follow-up report on overdentures supported by osseointegrated implants. Int J Oral Maxillofac Implants. 1996 May-Jun;11(3):291-8.
- 36.Abrahamsson I, Cardaropoli G. Peri-implant hard and soft tissue integration to dental implants made of titanium and gold. Clin Oral Implants Res. 2007 Jun;18(3):269-74.
- 37.Yang CY, Wang BC, Lee TM, Chang E, Chang GL. Intramedullary implant of plasma-sprayed hydroxyapatite coating: an interface study. J Biomed Mater Res. 1997 Jul;36(1):39-48.
- 38.Rivero DP, Fox J, Skipor AK, Urban RM, Galante JO. Calcium phosphate-coated porous titanium implants for enhanced skeletal fixation. J Biomed Mater Res. 1988 Mar;22(3):191-201.
- 39.Vercaigne S, Wolke JG, Naert I, Jansen JA. A mechanical evaluation of TiO₂-gritblasted and Ca-P magnetron sputter coated implants placed into the trabecular bone of the goat: Part 1. Clin Oral Implants Res. 2000 Aug;11(4):305-13.
- 40.Vercaigne S, Wolke JG, Naert I, Jansen JA. A histological evaluation of TiO₂-gritblasted and Ca-P magnetron sputter coated implants placed into the trabecular bone of the goat: Part 2. Clin Oral Implants Res. 2000 Aug;11(4):314-24.
- 41.Coelho PG, Suzuki M. Evaluation of an IBAD thin-film process as an alternative method for surface incorporation of bioceramics on dental implants. A study in dogs. J Appl Oral Science. 2005;13(1):87-92.
- 42.Roberts WE. Bone tissue interface. J Dent Educ. 1988 Dec;52(12):804-9.