



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

JANAINA TEIXEIRA DIAS

**Influência dos efeitos de uma superfície de implante
revestida com fosfato de cálcio na resposta óssea. Análise
biomecânica e topográfica.**

Araçatuba - SP

2015

JANAINA TEIXEIRA DIAS

**Influência dos efeitos de uma superfície de implante
revestida com fosfato de cálcio na resposta óssea. Análise
biomecânica e topográfica.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior.

Araçatuba - SP

2015

Dedicatória

É com muita alegria que venho dedicar este trabalho à minha família, responsável em grande parte pelo momento ao qual cheguei, me auxiliando, me incentivando e acreditando que todos os meus sonhos seriam possíveis. Foi de cada um deles que retirei forças e determinação para estar aqui hoje.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, todo corpo docente e funcionários, por todo conhecimento e dedicação oferecida durante esses cinco anos, foram fundamentais para minha formação acadêmica.

Em especial ao meu orientador Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior, por todo seu empenho em me conduzir pelos caminhos da pesquisa, tornando possível a realização deste trabalho. Sou muito grata pelo apoio, ensinamentos, orientação e incentivo.

A Prof^ª. Ass. Dr^ª. Daniela Ponzoni pela disponibilidade em fazer parte da banca examinadora.

À Doutoranda Sabrina Ferreira, pela colaboração durante a execução desse trabalho. Agradeço pela disponibilidade, dedicação, paciência e apoio.

Ao Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada e todos os professores, técnicos e colegas que dele fazem parte.

À Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos que viabilizou a realização deste estudo com a doação dos implantes de titânio utilizados.

À FAPESP pela concessão da bolsa de iniciação científica durante a realização do projeto.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Dirijo-me em primeiro lugar à Deus, responsável por me fazer acreditar que tudo seria possível, e me iluminar dia a dia com sua bondade e misericórdia, me concedendo forças e sabedoria.

Aos meus pais, Ademir Gonçalves Dias e Lucia da Silva Teixeira Dias, meus irmãos, Ademir Gonçalves Dias Filho e Jaqueline Teixeira Dias, pelo carinho, amor e confiança, amenizando a distância e impulsionando meus passos, de modo a me fazer acreditar que os sonhos seriam possíveis.

Aos meus amigos e amigas pelo carinho, motivação e companheirismo em todos os momentos destes 5 anos de faculdade. Em especial à minha amiga Jéssica Freitas de Andrade, que mais que amizade, dividiu comigo cada momento deste trabalho, me proporcionando momentos especiais dos quais pretendo levar comigo pra sempre.

Agradeço em especial também à doutoranda Sabrina Ferreira, por empenhar-se em ajudar, ensinar e orientar meus estudos durante a realização deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

(Leonardo da Vinci)

Resumo

DIAS, J.T. Influência dos efeitos de uma superfície de implante revestida com fosfato de cálcio na resposta óssea. Análise biomecânica e topográfica. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

Modificações topográficas e físico-químicas da superfície dos implantes têm sido propostas para aumentar a porcentagem de contato osso-implante, principalmente em áreas de tecido ósseo de menor densidade, favorecer as respostas biológicas em um período de regeneração mais curto e, conseqüentemente, favorecer o sucesso em longo prazo dos implantes osseointegráveis. O objetivo deste estudo é avaliar as superfícies de implantes de titânio comercialmente puro (Ticp) com superfície usinada com e sem deposição de fosfato de cálcio (CaP) pelo método semelhante ao biomimético e avaliar a interface osso/implante em modelo padronizado em tibia de rato. Foram realizadas análises topográfica (MEV e EDS) e biomecânica através da realização do torque reverso. Foram instalados 32 implantes de superfície usinada e 32 implantes com superfície modificada a base de CaP na metáfise tibial dos animais. Na análise topográfica observou-se que o grupo de superfície modificada a base de CaP produziu superfícies mais rugosas e homogêneas e o EDS não mostrou nenhuma contaminação em ambos os grupos. A análise biomecânica mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foi observada, aos 30 e 40 dias, entre os grupos GUS e GFO (Teste de Mann-Whitney, nível de significância de 5%). Concluiu-se que, a superfície modificada por CaP favoreceu a interação entre tecido ósseo e implante como pode ser observado pelos valores de torque reverso aos 30 e 40 dias estatisticamente superiores no grupo GFO.

Palavras chave: Implante dentário, Cálcio, Titânio

Abstract

DIAS, J. T. Evaluation of the effects of a calcium phosphate-coated titanium surface on bone response. Biomechanical and topographic analysis . Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

Topographic and physico-chemical surface modifications of implants have been proposed to increase the percentage of bone-implant contact, particularly in bone tissue areas of lower density, promote biological responses in a shorter period of regeneration and hence promote long-term success of dental implants. The objective of this study is to evaluate the surfaces of commercially pure titanium implants (TiCP) with machined surface with and without calcium phosphate deposition (CaP) by the method similar to biomimetic and evaluate the bone / implant interface in standardized model in rat tibia . Analyzes were performed topographic (MEV and EDS) and biomechanics through the completion of reverse torque. 32 machined surface implants and 32 implants with modified surface CaP base in tibial metaphyseal animals have been installed. In topographical analysis showed that the modified surface group CaP base produced rougher surfaces and homogeneous and the EDS showed no contamination in both groups. Biomechanical analysis showed a statistically significant difference ($p < 0.05$) was observed at 30 days and 40 days, between the GUS and GFO groups (Mann-Whitney test, 5% significance level). It was concluded that the surface modified by CaP favored the interaction between bone and implant tissue as shown by reverse torque values at 30 and 40 days statistically superior in GFO group.

Key-words: dental implant. Calcium. Titanium.

Listas e Sumário

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Preparo do Simulador de Fluido Corpóreo. (A) substâncias utilizadas, (B) Solubilização em agitador magnético.....	40pg
Figura 2: Análise do PH da solução.....	40pg
Figura3: Banho em H2O2.....	41pg
Figura 4 : Ticp imersos em SFC mais CaP.....	41pg
Figura 5: <i>Baseline</i> da segunda e terceira etapa de modificação da superfície.....	41pg
Figura 6 : Banho de H2O2.....	42pg
Figura 7 : Delineamento experimental dos grupos do estudo.....	42pg
Figura 8: (A)Tricotomia, (B) antissepsia com PVP-I na metáfise tibial.....	42pg
Figura 9: Incisão (A) e acesso à metáfise tibial (B).....	43pg
Figura 10: Fresagem com fresa lança (A) e leito ósseo fresado preparado para a instalação do implante (B).....	43pg
Figura 11: Implante sendo instalado com chave digital quadrada (A). Vista superior do implante instalado (B) e vista lateral (C).....	43pg
Figura 12: Microscopia Eletrônica de Varredura (A) implantes após a secagem do SBF. (B) Primeiro passagem pelo SBF + CaP. (C) Última passagem pelo SBF + CaP. (D) Após lavagem dos implantes.....	44pg
Figura 13: MEV das superfícies analisadas. (A) Grupo GFO 1.00 K X e (B) Grupo GUS 1.00 KX.....	44pg
Figura 14: EDS das superfícies analisadas. (A) Grupo GFO e (B) Grupo GUS.....	45pg
Figura 15: Gráfico dos valores médios de torque reverso nos períodos de 7, 15, 30 e 40 dias nos grupos GFO e GUS.....	45pg

LISTA DE ABREVIATURAS

SFC.....	Simulador de fluido corpóreo
CaP.....	Fosfato de cálcio
Ticp.....	Implante de titânio comercialmente puro
ELCOI.....	Extensão linear de contato entre tecido ósseo e implante
MEV.....	Microscopia eletrônica de varredura
EDS.....	Energia dispersa de raios x
GUS.....	Grupo usinado
GFO.....	Grupo fosfato de cálcio
PVPI.....	Polivinil Pirrolidona Iodo
EED.....	Espectrometria de energia dispersa
Ti.....	Titânio
Ca.....	Cálcio
P.....	Fósforo
HA.....	Hidroxiapatita
TPS.....	Plasma Spray de Titânio
pH.....	potencial Hidrogeniônico

LISTA DE FÓRMULAS QUÍMICAS

TiO_2	Óxido de Titânio
Al_2O_3	Óxido de Alumínio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO_3	Bicarbonato de Sódio
KCl	Cloreto de Potássio
K_2HPO_4	Fosfato de Potássio
Na_2SO_4	Sulfato de Sódio
HCl	Ácido Clorídrico
$\text{CaC}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Carbonato de Cálcio Dihidratado
$\text{MgCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	Cloreto de Magnésio Monohidratado
$\text{NA}_2 (\text{CH}_2 \text{OH})_3$	Metóxido de Sódio
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio

Sumário

Resumo	8
Abstract.....	10
I. Introdução.....	18
II. Objetivo	21
III. Hipótese.....	23
IV. Materiais e Métodos	25
1. Materiais	26
1.1.Implantes	26
2. Métodos.....	26
3. Delineamento experimental	28
3.1 Instalação dos implantes	28
3.2. Cuidados pós operatória.....	29
4. Eutanásia e coleta do material.....	30
5. Análise Biomecânica	30
5.1. Torque reverso	30
5.2 <i>Microscopia Eletronica de Varredura e Energia Dispersiva de Raios x</i>	30
6. Análise estatística.....	30
V. Resultados.....	32
1. Topografia das superfícies pré implantação nas tíbias (MEV e EDS)	32
2. Exame clínico	32
3. Análise biomecânica.....	32
VI. Discussão	34
VII. Conmclusão	35
Referências	36

Tabelas e Figuras	40
Anexos.....	46

Introdução

I. Introdução

Nos últimos anos pode-se observar um crescente aumento no número de pacientes que procuram a reabilitação com implantes osseointegráveis para repor os elementos dentais perdidos^{1,2}. Apesar dos excelentes resultados obtidos no protocolo desenvolvido em pacientes com boa qualidade e quantidade óssea, situações clínicas desfavoráveis, como áreas posteriores de maxila, áreas enxertadas, pacientes com alterações sistêmicas como diabetes, osteoporose e que apresentam pobre qualidade e quantidade óssea, podem influenciar o sucesso das reabilitações implantossuportadas³.

Modificações topográficas e físico-químicas da superfície dos implantes têm sido propostas para aumentar a porcentagem de contato osso-implante, principalmente em áreas de tecido ósseo de menor densidade, favorecer as respostas biológicas em um período de regeneração mais curto e, conseqüentemente, favorecer o sucesso em longo prazo dos implantes osseointegráveis^{4,5,6}.

Alguns métodos começaram a ser implantados visando alterar a superfície de implantes, como as técnicas de adição (recobertas por plasma spray de titânio – TPS e de hidroxiapatita (HA), recobrimentos com HA e outros fosfatos de cálcio - CaP)^{6,7}, ou subtração (tratamentos com ácido, associados ou não ao jateamento com óxido de titânio – TiO₂ ou óxido de alumínio – Al₂O₃ e irradiação com laser)^{8,9}.

Os diferentes tipos de tratamentos conferem à superfície dos implantes uma topografia mais rugosa, além de alterações físico-químicas que favorecem a retenção do coágulo sanguíneo, aumentam a resistência ao torque de remoção dos implantes, interferem nas respostas celulares estimulando a osseointegração e, conseqüentemente, permitem que estes implantes possam ser submetidos à carga protética após um tempo de regeneração menor, quando comparados aos implantes de superfície usinada^{8,10,11}.

O CaP é uma cerâmica bioativa, exclusivamente osteocondutora, similar a HA, muito embora não seja um componente natural do osso^{12,13,14}. Recobrimentos de superfície de implantes com CaP têm recebido especial atenção, já que aceleram a osseointegração, especialmente em condições de limitada quantidade e qualidade tecidual óssea^{15,16}. Inicialmente proposto por Abe et al.¹⁷, o método biomimético utiliza uma solução denominada *Simulated Body Fluid* (SBF) ou solução de fluido corpóreo (SFC), que possui composição química, temperatura e potencial hidrogeniônico (ph) similares ao plasma sanguíneo. As principais vantagens desta técnica incluem a possibilidade de controle da

espessura da camada depositada, o aumento da adesão ao substrato metálico e a topografia de superfície que aumenta a reposta do hospedeiro ao implante, favorecendo a osseointegração em períodos de tempo mais curtos^{18,19}.

Objetivo

II. Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar as superfícies de implantes de titânio comercialmente puro (TiCP) com superfície usinada com e sem deposição de CaP pelo método semelhante ao biomimético.

Hipótese

III. Hipótese

A hipótese do presente estudo foi de que os valores de extensão linear de contato entre tecido ósseo e implante (ELCOI) seriam maiores no grupo com superfície modificada a base de CaP em comparação ao grupo usinado. Além disso, foi hipotetizado que os valores de torque reverso na análise biomecânica também seriam maiores para o grupo CaP.

Materiais e Métodos

IV. Materiais e Métodos

1. Materiais

1.1. Implantes

Foram utilizados neste estudo 64 (sessenta e quatro) implantes de Ticip de 1,6mm de diâmetro e 3,0mm de altura (Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brasil) com duas superfícies diferentes:

A – Implante Ticip com superfície usinada – 32 unidades

B – Implante Ticip com superfície modificada a base de CaP – 32 unidades

2. Métodos

2.1. Preparação da Superfície Teste (método similar ao biomimético de modificação de superfície):

32 implantes de titânio Ticip foram preparados segundo um método similar ao biomimético de modificação de superfície^{20,21}. A primeira etapa foi o preparo da SBF seguindo a modificação da solução original de Aparecida (2009)²² proposta inicialmente por Kukubo (2006)¹⁸.

1ª ETAPA: Preparo do SBF:

Em um béquer foi adicionado 500 ml de água deionizada, e sob agitação foram acrescentados os seguintes compostos, respectivamente, aguardando sempre cada solubilização (Figura 1A e 1B):

1. NaCl – 8,003g
2. NaHCO₃ – 0,335gr
3. KCl – 0,224gr
4. K₂HPO₄ – 0,174gr
5. Na₂SO₄ – 0,071gr
6. HCl – 40 ml (1 Mol)
7. CaC₂.2H₂O – 0,368gr
8. MgCl.H₂O – 0,305gr
9. NA₂(CH₂ OH)₃ – 6,057gr

Após preparo da solução o potencial hidrogeniônico (pH) foi verificado com pHmetro e o valor atingido ficou entre 7,4 e 7,5 mostrando-se ideal para uso (Figura 2). Logo após, foi adicionado água até que se atingisse 1000ml. A solução foi armazenada em geladeira convencional para posterior uso no prazo de 30 dias.

2ª ETAPA: Preparação da Superfície dos implantes para receber o CaP

Nesta etapa realizou-se o ataque ácido da superfície do TiCP com banhos em ácido nítrico, sulfúrico e clorídrico. Em seguida, imersão em 50mL de solução de H₂O₂ 10V (Figura 3) e levados para uma estufa, e lá permaneceram por um período de 24 horas à 60°C, para a ativação da superfície. Após a ativação, os implantes foram mantidos em estufa por um período de aproximadamente 7 horas à 60°C para secagem da superfície. Após estes procedimentos os implantes começaram a ser tratados com a SBF também por um período de 24 horas na solução em estufa à 37°C seguida de secagem em estufa à 37°C.

3ª ETAPA: Modificação da superfície com CaP

SBF numa proporção de 2 gramas de CaP para cada 10ml de SBF foi preparado, e para recobrimento total dos implantes foram utilizados 100ml de solução para cada troca (Figura 4). A mistura foi feita através de um agitador magnético. A imersão dos implantes nessa solução ocorreu por um período de 72 horas em estufa à 37°C, com trocas diárias da solução para manter o equilíbrio dos íons. A última troca foi realizada com álcool absoluto mais CaP na mesma concentração e tempo da utilizada na SBF. Após este período foram deixados em estufa a 60°C até secagem total da superfície (Figura 5).

4ª ETAPA: Limpeza da superfície e esterilização

Em seguida, os implantes foram submetidos a banhos, respectivamente, de:

- Água oxigenada (H₂O₂) 10 volumes (Figura 6);
- Solução salina fisiológica 0,9%;
- E álcool absoluto.

Após a realização desta etapa os implantes foram levados novamente a estufa à 60°C para sua completa secagem e foram embalados em grau cirúrgico e encaminhados a Implalife® para serem submetidos a processo de esterilização por raios gama. Parte dos implantes tratados foi reservada para realização das análises de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Energia Dispersa de Raios x (EDS) na UNESP Campus Ilha Solteira.

3. Delineamento Experimental

Para a realização deste estudo, foram utilizados 32 (trinta e dois) ratos (*rattus norvegicus*, *albinus*, *Wistar*), machos, adultos, com peso corporal em torno de 300 gramas. Aos animais foram pareados no começo do estudo para diminuir o desvio padrão. Os animais então cedidos pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP foram mantidos em gaiolas com 5 (cinco) animais cada, em ambiente climatizado e alimentados com ração sólida padrão e água “*ad Libitum*”, durante todo o experimento.

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FOA-UNESP sob protocolo 005276 2/2 (Anexo1). Os mesmos animais serão enquadrados em dois grupos experimentais (Figura 7):

Grupo Controle/Usinado (GUS): implante de titânio de superfície usinada instalado na tíbia esquerda;

Grupo Fosfato de Cálcio (GFO): implante de titânio com superfície modificada a base de fosfato de cálcio instalado na tíbia direita.

3.1 Instalação dos implantes

Um estudo piloto foi realizado utilizando 3 espécimes com objetivo de calibrar o operador para posterior cirurgia dos demais animais. Após jejum pré-operatório de 8 horas os animais foram anestesiados por sedação através de administração via intramuscular de cloridrato de ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil), na dosagem de 10mg/Kg, e de cloridrato de xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5mg/Kg. Foi realizada em complementação anestésica a infiltração local de solução de cloridrato de mepivacaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre 100®, DFL LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) na dosagem de 0,3 ml/Kg na metáfise tibial.

Foi realizada tricotomia da região lateral direita e esquerda e antissepsia pré-operatória por fricção de gaze embebida em polivinil pirrolidona iodo degermante a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto) associado ao polivinil pirrolidona iodo tópico a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto) (Figura 7A e B).

A tíbia então foi acessada com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15C (Feather

Industries Ltda, Tokyo, Japão), montada em cabo de bisturi número 3 (Hu-Friedy®, German). Uma incisão linear por planos anatômicos de 3 cm foi realizada na região lateral da metáfise tibial e a pele e o periósteo foram descolados e devidamente afastados com um descolador tipo Molt (Hu-Friedy®, German), o suficiente para haver exposição da porção lateral da metáfise tibial (Figura 8A e B).

Após exposição do tecido ósseo foi realizado osteotomia bi-cortical com fresa do tipo lança de 1,4 mm de diâmetro montada em contra-ângulo redutor de 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinvile, Brasil), que por sua vez estava conectado a um motor elétrico de rotação controlada (modelo BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1500 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) (Figura 9). Cada animal recebeu 2 implantes de titânio com travamento e estabilidade inicial, cada um de 1,6 mm de diâmetro e 3,0 mm de altura (Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brazil), sendo 1 em cada metáfise tibial. Na tíbia direita foi instalado um implante de 1,6 x 3,0 mm com superfície modificada à base de CaP e na tíbia esquerda um implante de 1,6 x 3,0 mm com superfície usinada (Figura 10A, B e C).

Após a instalação dos implantes o retalho cirúrgico foi reposicionado e suturado por planos, sendo o plano muscular suturado através pontos contínuos simples com fio absorvível de Poliglactina 910 5-0 (Vicryl 5-0®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil). No plano cutâneo a sutura foi por pontos interrompidos simples com fio de Nylon 5-0 (ETHILON Nylon Suture®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil).

3.2 Cuidados Pós-Operatórios

Imediatamente após o procedimento cirúrgico os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (0,1mL/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) em dose única e de Dipirona Sódica (1mg/kg/dia, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil). Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP em gaiolas com cinco animais cada, em ambiente climatizado, sob jejum pós-operatório de 8 horas e, após este período, alimentação com ração sólida padrão e água “*ad Libitum*”, até a eutanásia dos animais nos períodos de 7, 15, 30 e 40 dias pós-operatórios.

4. Eutanásia e Coleta do Material

A eutanásia dos espécimes foi realizada nos períodos de 7, 15, 30 e 40 dias pós operatórios, sendo 8 animais por período. A eutanásia foi realizada por dose excessiva de anestésico .

5. Análise Biomecânica

5.1. Torque Reverso

No momento da eutanásia nos períodos de 7, 15, 30 e 40 dias, os implantes foram reabertos para exposição e realização do torque reverso. Um monta-implante (Implalife Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brasil) foi adaptado ao hexágono do implante e um torquímetro analógico (15-BTG, Tohnichi, Tokyo, Japan) acoplado ao monta-implante. Um movimento anti-horário foi aplicado aumentando-se o torque reverso até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo completamente a interface osso/implante, momento em que o torquímetro registrou o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton por centímetro (N.cm). Os valores obtidos foram agrupados e submetidos à análise estatística.

5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura e Energia Dispersiva de Raios x

Os implantes foram analisados quanto à topografia pré instalação nos animais através do MEV (MEV modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda, 97) (Figura 12). Finalmente, a espectrometria de energia dispersiva (EED) foi empregada para avaliar a formação da película de óxido e sua composição.

6. Análise estatística

A análise estatística foi conduzida e dependeu da distribuição desses dados em relação à curva de normalidade. Os testes foram conduzidos através de *software* SigmaPlot 12.0, utilizado para análise estatística em estudos na área de saúde.

Resultados

V. Resultados

1. Topografia das superfícies pré-implantação nas tíbias (MEV, EDS)

O MEV das superfícies analisadas demonstrou diferenças topográficas entre elas (Fig. 13A e B). O tratamento da superfície com fosfato de cálcio produziu superfícies rugosas e homogêneas com padrão morfológico regular e presença de partículas esféricas, em escala nanométrica (tamanho de cada partícula menor do que 100 nanômetros, utilizando-se como referência a escala do microscópio). A análise por EDS não revelou qualquer contaminação nas superfícies dos implantes analisados e mostrou picos de titânio (Ti) para o grupo GUS. O EDS do grupo GFO manteve as características do GUS, diferenciando-se da mesma pela presença de picos significativos referentes aos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P), obtidos pela deposição química de CaP (Fig. 14A e B).

2. Exame Clínico

Os animais não apresentaram qualquer alteração tecidual, não verificou-se sinais de infecção e nem de fratura óssea nas tíbias. Nos implantes de GFO, a integridade do recobrimento de fosfato de cálcio foi mantida. Observou-se também que esses implantes apresentaram-se em parte recobertos por tecido ósseo neoformado, sendo necessária a exposição do parafuso de cobertura dos mesmos (cover screw), cuidadosamente, com broca esférica número 2, para possibilitar a realização do torque-reverso.

3. Análise Biomecânica

Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foi observada, aos 30 e 40 dias, entre os grupos GUS e GFO (Teste de Mann-Whitney, nível de significância de 5%) (Fig. 15)

Discussão

VI. Discussão

A análise topográfica das superfícies estudadas mostrou que GFO apresentaram uma morfologia complexa, que favoreceram o recobrimento por tecido ósseo, quando comparadas com GUS. As propriedades físico-químicas e morfológicas da superfície do implante tem uma função direta na osteogênese que ocorre na interface osso/implante, influenciando uma série de eventos coordenados, que incluem a adsorção proteica, proliferação, diferenciação celular e a deposição de matriz óssea²³.

De acordo com Faeda et al. (2009)²⁴ o tratamento de superfícies com feixe de laser parece ser um promissor método para a modificação de superfícies de implantes dentários, já que produzem um padrão de superfície com importantes propriedades na osseointegração, melhorando a retenção osso/implante e resultando em uma melhor e mais rápida integração quando comparada aos implantes usinados. Esses resultados também foram observados neste estudo, em que os valores de torque reverso de GFO foram estatisticamente superiores aos do grupo GUS, aos 30 e 40 dias pós-operatório.

A maior rugosidade e recobrimento ósseo observados no grupo GFO, estatisticamente significantes quando comparado ao grupo GUS, pode estar relacionada ao aumento na integração óssea que ocorre em superfícies rugosas. Em muitos estudos que investigam diferentes modificações de superfície, uma correlação positiva tem sido descoberta entre rugosidade e osseointegração (maiores valores de torque reverso), sendo que em grande parte desses trabalhos, a maior rugosidade foi apresentada pelas superfícies recobertas por CaP^{25,26,27}. Além disso, os melhores resultados obtidos com essas superfícies se devem não somente ao padrão topográfico, mas também à físico-química, como demonstrado por meio do EDS, que revelou picos de Ca e P no grupo GFO.

Segundo Kokubo et al. (2003)²⁸, um dos pré-requisitos para um material ligar-se ao osso é a formação de uma camada de apatita biologicamente ativa na interface material/osso, usualmente conhecida como “bone-like apatite”. Tal camada de apatita é similar à fase mineralizada do tecido ósseo, em composição e estrutura, o que favorece a proliferação e diferenciação celular em osteoblastos. Quando isso ocorre, uma ligação química é formada entre o osso e a camada de apatita, reduzindo a energia interfacial entre elas.

Os favoráveis resultados obtidos nesse estudo após o recobrimento das superfícies por CaP estão associados à estabilidade da interface formada entre tecido ósseo e implante, como verificada por MEV, pós-implantação, que mostrou que o rompimento ocorreu na interface osso/osso e não na interface implante e osso, como observado para o grupo GUS.

Pesquisas sobre tratamentos de superfícies com materiais bioativos têm mostrado resultados histomorfométricos e biomecânicos, a curto e a longo prazo, superiores aos

observados para as superfícies não recobertas^{3,29} Entretanto, é difícil concluir precisamente o que causa aumento na resposta óssea à uma superfície modificada, principalmente nos implantes recobertos por Hidroxiapatita (HA), já que esse processo altera a química por adição de HA, mas simultaneamente, pode alterar a micro e nanorrugosidade. Além disso, dependendo do processo de aplicação da HA, pode ocorrer alteração na física de superfície²⁶.

Considerando a importância da modificação físico-química das superfícies para favorecer o processo de osseointegração, principalmente em áreas de baixa qualidade e quantidade óssea e nos casos de carga protética imediata ou precoce, mais estudos são necessários para demonstrar o comportamento histológico das mesmas, bem como a sua estabilidade durante a função.

VII. Conclusão

A superfície modificada por CaP favoreceu a interação entre tecido ósseo e implante como pode ser observado pelos valores de torque reverso aos 30 e 40 dias estatisticamente superiores no grupo GFO.

Referências

VIII. Referências

1. Bergkivist G, Sahlholm S, Nilner K, Lindh C. Implant-supported fixed prostheses in the edentulous maxilla 2-year clinical and radiological follow-up of treatment with non-submerged ITI implants. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15: 351-9.
2. Coelho PG, Cardaropoli G, Suzuki M, Lemons JE. Early healing of nanothickness bioceramic coatings on dental implants. An experimental study em dogs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;88(2):387-93.
3. Thomas K, Cook SD. Relationship between surface characteristics and the degree of bone-implant integration. *J Biomed Mater Res* 1992; 26 (6): 831-833.
4. Xavier SP, Carvalho PSP, Beloti MM, Rosa AL. Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. *J Dent* 2003; 31 (3): 173-180.
5. Buser D, Nydegger T, Hirt HP, Cochran DL, Nolte LP. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1998; 13(5): 611-619.
6. Gotfredsen K, Berglundh T, Lindhe J. Bone reactions adjacent to titanium implants with different surface characteristics subjected to static load. A study in the dog (II). *Clin Oral Implants Res* 2001; 12 (3): 196-201.
7. Lin A, Wang CJ, Kelly J, et al. The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone-implant fixation in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Sep-Oct; 24(5):808-16.
8. Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, et al. Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. *J Periodontol*. 2003 Jul;74(7):945-56.
9. Braga FJC, Marques RFC, Filho EA, et al.. Surface modification of Ti dental implants by Nd:YVO4 laser irradiation. *Appl Surf Sci* 2007; 253(23): 9203-9208.
10. Klokkevold PR, Johnson P, Dadgostari S, et al. 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): 350-357.
11. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Sep; 20 Suppl 4:172-84. Review.

12. Carvalho PSP, Luppino F, Mendes VC: Histofisiologia óssea e os biomateriais aplicados à implantodontia. In: BEZERRA FJ *Terapia clínica avançada em implantodontia* (ed 1). São Paulo, Artes Médicas, 2002, p 17
13. Schliephake H, Sharnweber D, Dard M, et al: Biological performance of biomimetic calcium phosphate coating of titanium implants in the dog mandible. *J Biomed Mater Res* 64A: 225, 2003.
14. Simank HG, Stuber M, Frahm R, et al: The influence of surface coatings of dicalcium phosphate (DCPD) and growth and differentiation factor-5 (GDF-5) on the stability of titanium implants in vivo. *Biomaterials* 27: 3988, 2006.
15. Hayakawa T, Yoshinari M, Nemoto K, et al. Effect of surface roughness and calcium phosphate coating on the implant/bone response. *Clin Oral Implants Res.* 2000 Aug; 11(4):296-304
16. Park EK, Lee YE, Choi JY, et al. Cellular biocompatibility and stimulatory effects of calcium metaphosphate on osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells. *Biomaterials.* 2004 Aug; 25(17):3403-11.
17. Abe Y, Kokubo T, Yamamuro T. Apatite Coating on Ceramics, Metals and Polymers Utilizing A Biological Process. *J Mater Sci Mater Med* 1990; 1(4): 233-38.
18. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 2006; 27:2907-15.
19. Nogueras-Bayona J, Gil FJ, Salsench J, Martinez-Gomis J. Roughness and bonding strength of bioactive apatite layer on dental implants. *Implant Dent* 2004; 13 (2): 185-189.
20. Queiroz TP, Souza FA, Gustaldi AC, Margonar R, Garcia-Júnior IR, Hochuli Vieira E. Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and topographical analysis in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* **JCR**2013; v. 24, p. 896-903.
21. Souza FA, Queiroz TP, Gustaldi AC, Garcia-Júnior IR, Magro-Filho O, Nishioka RS, Sisti KE, Sonoda CK. Comparative study of commercially pure Ti implants with surfaces modified by laser with and without silicate deposition: Biomechanical and scanning electron microscopy analysis. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* **JCR**2013; v. 101B, p. 76-84.
22. Aparecida AH, Fook MVL, Gustaldi AC. Biomimetic apatite formation on Ultra-High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE) using modified biomimetic solution. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2009; n. 20, p. 1215-1222.

23. Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Keller J, Stanford C. Differentiation of preosteoblasts in affected by implant surface microtopographies. *J Biomed Mater Res A* 2004; 69(3): 462-8.
24. Faeda RS, Tavares HS, Sartori R, Guastaldi AC, Marcantonio E JR. Evaluation of titanium implants with surface modification by laser beam. Biomechanical study in rabbit tibias. *Braz Oral Res* 2009; 23(2):137-43.
25. Gottlander M, Johansson CB, Wennerberg A, Albrektsson T, Radin S, Ducheyne P. Bone tissue reactions to an electrophoretically applied calcium phosphate coating. *Biomaterials* 1997; 18: 551-7.
26. Wennerberg A, Albrektsson T. Structural influence from calcium phosphate coatings and its possible effect on enhanced bone integration. *Acta Odontol Scand.* 2009; 67: 333-40.
27. Wong M, Eulenberger J, Schenk R, Hunziker E. Effect of surface topology on the osseointegration of implants materials in trabecular bone. *J Biomed Mater Res* 1995; 29: 1567-75.
28. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with diferente mechanical properties. *Biomaterials* 2003; 24(13): 2161-75.
29. Park YS, Yi KY, Lee IS, Han CH, Jung YC. The effects of íon beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the grit-blasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2005; 20(1): 31-8.

FIGURAS



Figura 1: Preparo do Simulador de Fluido Corpóreo. (A) substâncias utilizadas, (B) Solubilização em agitador magnético.



Figura 2: Análise do pH da solução



Figura 3: Banho em H₂O₂



Figura 4: Tics imersos em SFC mais CaP

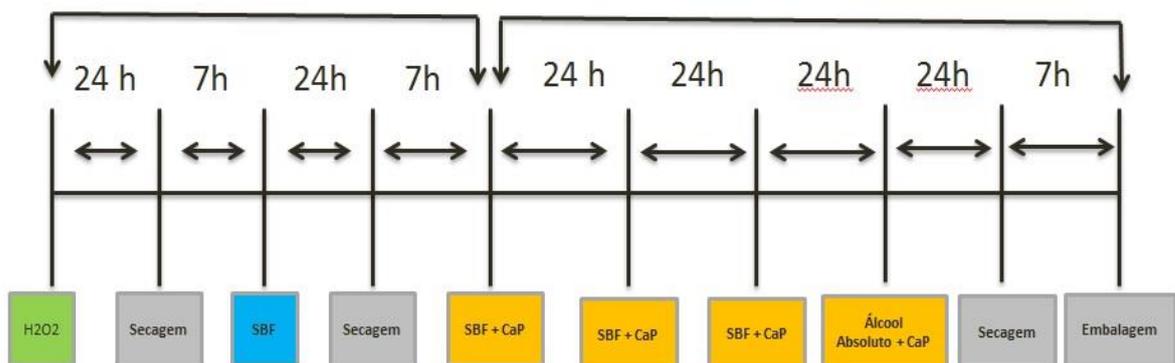


Figura 5: *Baseline* da segunda e terceira etapa de modificação da superfície.



Figura 6 : Banho de H₂O₂

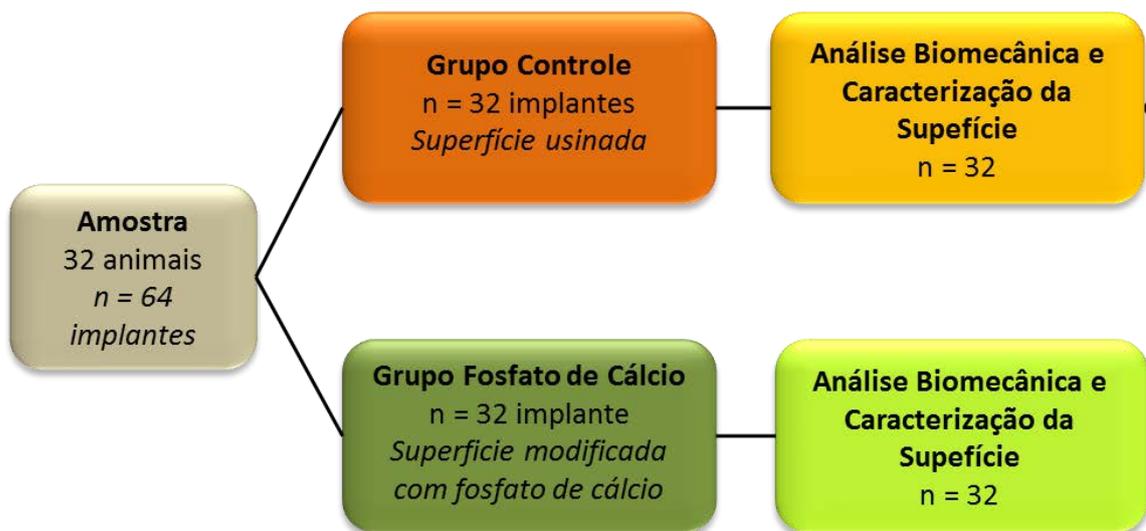


Figura 7 – Delineamento experimental dos grupos do estudo



Figura 8: (A)Tricotomia, (B) antissepsia com PVP-I na metáfise tibial



Figura 9: Incisão (A) e acesso à metáfise tibial (B).

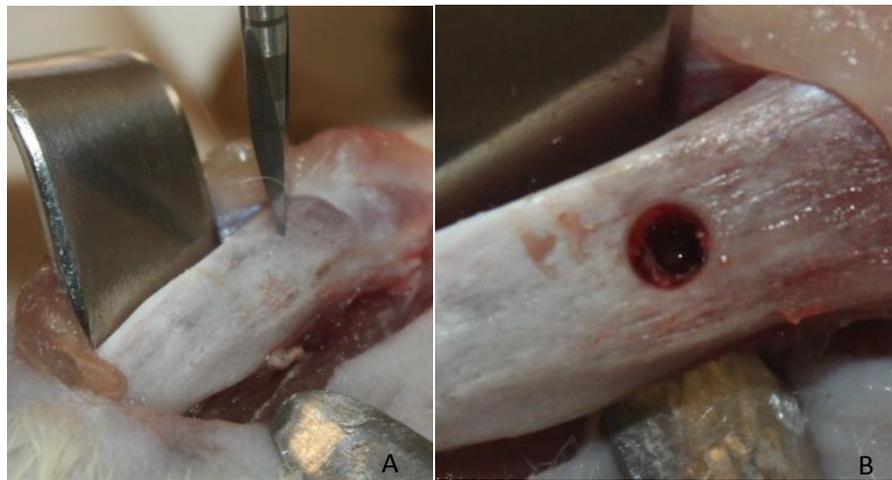


Figura 10: Fresagem com fresa lança e leito ósseo fresado preparado para a instalação do implante (B).



Figura 11: Implante sendo instalado com chave digital quadrada (A). Vista superior do implante instalado (B) e vista lateral (C).

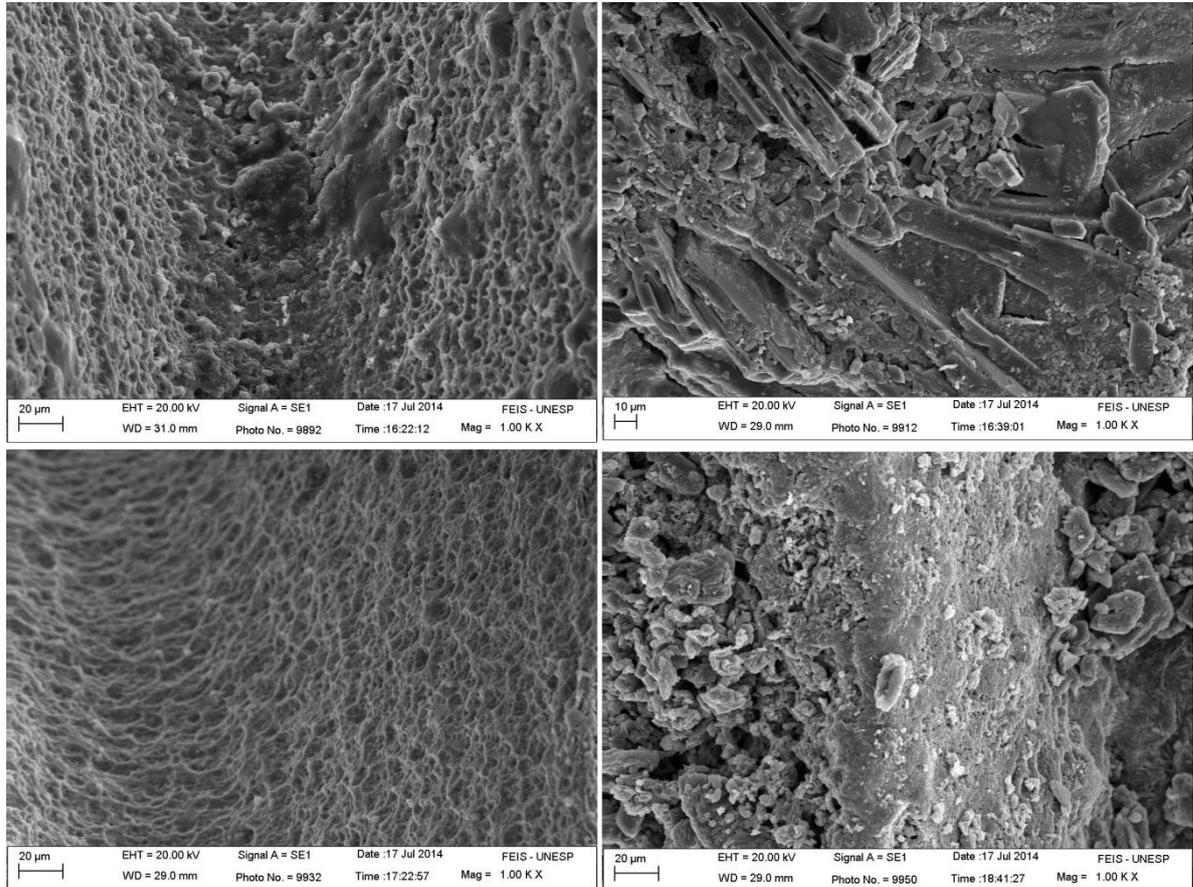


Figura 12: Microscopia Eletrônica de Varredura (A) implantes após a secagem do SBF. (B) Primeiro passagem pelo SBF + CaP. (C) Última passagem pelo SBF + CaP. (D) Após lavagem dos implantes.

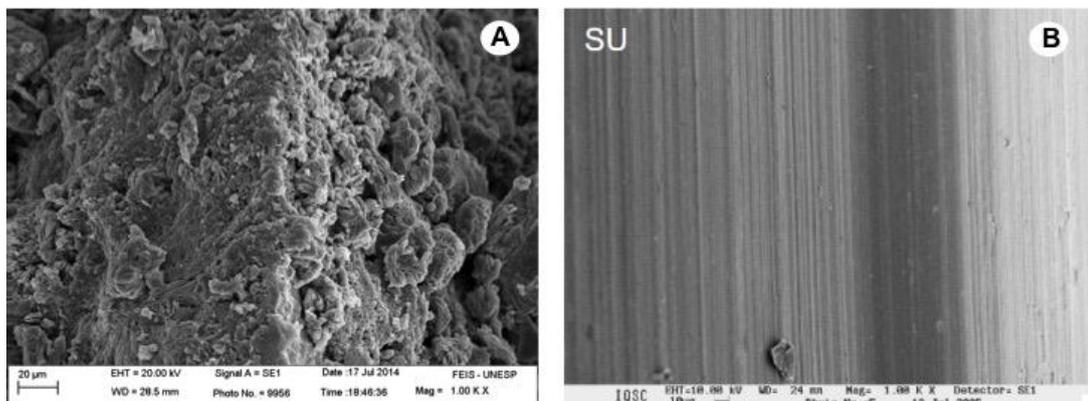


Figura 13: MEV das superfícies analisadas. (A) Grupo GFO 1.00 K X e (B) Grupo GUS 1.00 KX.

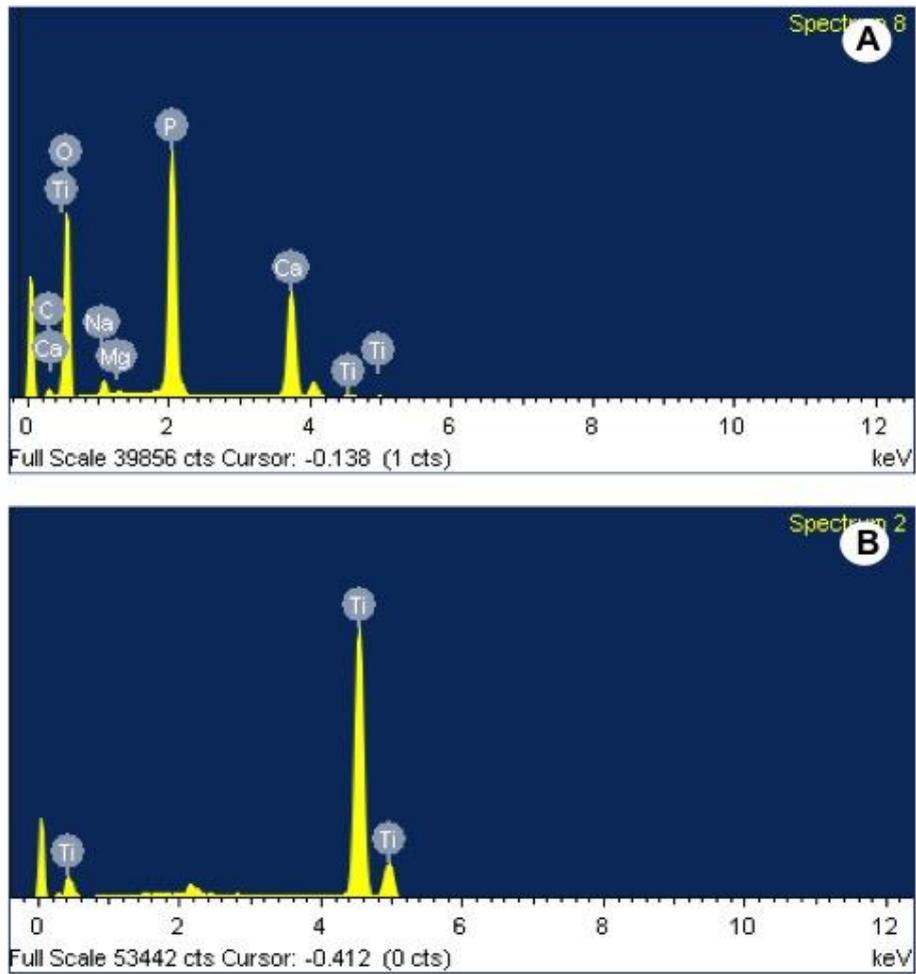


Figura 14: EDS das superfícies analisadas. (A) Grupo GFO e (B) Grupo GUS

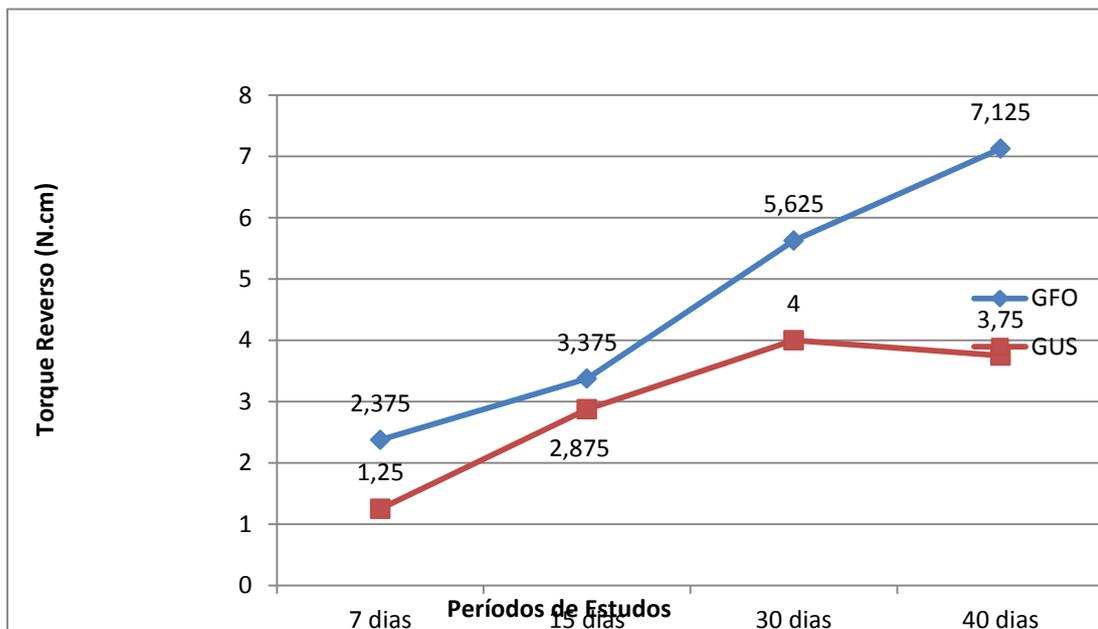


Figura 15: Gráfico dos valores médios de torque reverso nos períodos de 7, 15, 30 e 40 dias nos grupos GFO e GUS.

Anexo 1- Comitê de Ética Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação dos efeitos de uma superfície de implante revestida com fosfato de cálcio na resposta óssea. Análise biomecânica, topográfica, histométrica e imunoistoquímica", Processo FOA nº 2013-01205, sob responsabilidade de Idelmo Rangel Garcia Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 12 de março de 2014.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 06 de Setembro de 2014.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 06 de Outubro de 2014.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Evaluation of the effects of a calcium phosphate-coated titanium surface on bone response. Biomechanical, topographic, histometric and immunohistochemistry analysis", Protocol FOA nº 2013-01205, under the supervision of Idelmo Rangel Garcia Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 12, 2014.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: September 06, 2014.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: October 06, 2014.

Prof. Dr. Edilson Ervolino
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Menção - CEP. 16015-000 - ARAÇATUBA - SP
Fone (16) 3630-3234 Email CEUA: ceua@foc.unesp.br