

Bruna Cabrera Capalbo

***Osseointegração de implantes de titânio recobertos com
nanotubos e instalados sem estabilidade primária.***

***Influência da associação
adesivo fibrínico/ácido tranexâmico***

Araçatuba – SP

2014

Bruna Cabrera Capalho

**Osseointegração de implantes de titânio recobertos com
nanotubos e instalados sem estabilidade primária.
Influência da associação
adesivo fibrínico/ácido tranexâmico**

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para obtenção do Título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Orientadora: Prof^ª. Adj. Maria Cristina Rosifini Alves-Rezende

Araçatuba – SP

2014

Dedicatória

Dedicatória

Com muito carinho dedico este trabalho à minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim, cada um de seus atos foi uma oportunidade que eu tive para crescer e me tornar o que sou. Agradeço todos os dias pela presença em todos os momentos, amo vocês!

Agradecimentos

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por sempre iluminar o meu caminho e renovar a minha fé a cada dia.

Aos meus pais, Marcos Roberto Capalbo e Lúcia Sanchez Cabrera Capalbo, e a minha irmã Leticia Cabrera Capalbo por sempre me incentivarem a superar as dificuldades e ir atrás dos meus sonhos, por estarem presente em todos os momentos, pela compreensão e amor incondicional.

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 à minha orientadora Profa. Dra. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende, por todo seu empenho em me conduzir pelos caminhos da pesquisa tornando possível a realização deste trabalho. Sou muito grata por seu apoio, paciência, ensinamentos, disponibilidade, atenção e incentivo.

Ao Guilherme Henrique de Souza Poli, por me apoiar e me ajudar na conquista de meus objetivos.

Às queridas amigas do Colégio Anglo Araçatuba, que mesmo com a distância sempre demonstraram seu apoio e carinho.

À Hiskell F. Fernandes de Oliveira, Marcela Ito Rey, Bruna de Oliveira, Isabella Pagioro de Lima, Ana Carla Fabrício Ornelas e Jéssica Quereza de Freitas pela amizade e companheirismo tanto nos momentos bons como nos ruins.

Que os vossos esforços desafiem as possibilidades.
Lembraí-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível.
Charles Chaplin

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar
a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis.
José de Alencar

Resumo

Capalbo BC; Alves Rezende MCR. Osseointegração de implantes de titânio recobertos com nanotubos e instalados sem estabilidade primária. Influência da associação adesivo fibrínico/ácido tranexâmico. 71f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

RESUMO

Nanotubos de óxido de titânio (TiO_2) podem potencializar a diferenciação celular, melhorando a integração do tecido ósseo em superfícies de implantes dentários, particularmente quando estes são associados a substitutos ósseos. O propósito deste trabalho foi avaliar o reparo ósseo ao redor de implantes recobertos com nanotubos, associados à adesivo fibrínico/ácido tranexâmico e instalados sem estabilidade primária. Foram confeccionados 80 implantes de *Titânio* ASTM F67 (*Grau* 4), com dimensões de $\varnothing 2.1 \times 2.8$ mm, usinados em torno CNC STAR®, modelo SR-20RII, com potência de 2,2 kW. Foi empregada ferramenta de roscamento externo ISCAR® 16 ER 0.80 ISO IC 908 (metal duro revestido com TiNAl) e fluido de corte ECOCUT 910 (FUCHS®) em abundância. Os implantes foram divididos em dois grupos (n=40): Grupo I (Usinado) e Grupo II (Anodizado). Para anodização eletroquímica foi utilizado o meio Glicerol- H_2O DI (50-50 v/v) + NH_4F com concentração variando de 0,5 a 1,5 % em massa, tensão de 10 a 30V, tempo de 1 a 3 horas, sob agitação mecânica. Os implantes foram identificados, acondicionados individualmente, esterilizados por meio de radiação gama (25 kGy) e divididos em GI (usinado), GII (usinado/adesivo fibrínico), GIII (usinado/ácido tranexâmico), GIV (usinado/adesivo fibrínico/ácido tranexâmico), GV (anodizado), GVI (anodizado/adesivo fibrínico), GVII (anodizado/ácido tranexâmico) e GVIII (anodizado/adesivo fibrínico/ácido tranexâmico). Na sequência foram implantados em tíbias de 80 ratos machos (250 gramas), os quais foram anestesiados (Xylazina/Ketamina) e tricotomizados em suas patas traseiras direitas. Após incisão, divulsão, acesso ao leito ósseo e perfuração com sobrefresagem (broca única/ $\varnothing 2.5 \times 3.3$ mm comprimento) sob irrigação com soro fisiológico, os leitos cirúrgicos foram preenchidos com o material destinado a cada grupo e os implantes instalados. Na sequência foi realizada sutura (fio 4.0). Os animais foram eutanasiados aos 60 dias pós-operatórios. As peças foram processadas em MMA (Stevenel's blue/Alizarin red S). Os resultados obtidos

mostraram diferenças estatísticas significativas para contato osso/implante e percentual de área óssea dentro do limite das roscas entre os Grupos I e VIII. Concluiu-se que o reparo ósseo ao redor de implantes instalados sem estabilidade primária foi favorecido pela anodização da superfície do implante (nanotubos) e sua associação a adesivo fibrínico /ácido tranexâmico.

Descritores: Implante Dentário, Osseointegração, Propriedades de Superfície

Abstract

Capalbo BC; Alves Rezende MCR. Osseointegration of titanium implants covered by nanotubes and installed without primary stability. Influence of association fibrin adhesive/tranexamic acid. (Academic Paper). Araçatuba: Faculty of Dentistry – São Paulo State University; 2014. 71p

Abstract

It is well known that the rate and strength of osseointegration is related to the direct connection between living bone and implant surface. Surface properties, such as topography, wettability, charge, surface energy, crystal structure, roughness, chemical potential, strain hardening, impurities, passive film thickness and coatings play important role for long-term clinical success. The association of fibrin-adhesive with tranexamic acid (TEA) is used to reduce fibrin degradation and prevent early blood clot breakdown. The aim of this study was to evaluate the bone healing around implants with anodized surface associated with fibrin adhesive/ tranexamic acid and installed with compromised primary stability. 80 implants of titanium ASTM F67 (Grade 4) with dimensions of 2.1 x 2.8mm Ø were manufactured. They were divided (n=10) into Group I (machined Ti), Group II (machined Ti / fibrin adhesive), Group III (machined Ti / tranexamic acid) Group IV (machined Ti / fibrin adhesive/tranexamic acid), Group V (anodized Ti), Group VI (anodized Ti / fibrin adhesive), Group VII (anodized Ti / tranexamic acid) Group VIII (anodized Ti / fibrin adhesive/tranexamic acid). The anodized surface was formed using glycerol electrolyte (glycerol DI-H₂O) with DC fields 50-50 v / v and NH₄F solution (0.5 to 1.5%) by applying a pulsed DC field to the specimen (10-20V) for a period of 3 hours at 37°C. The implants are surgically placed in tibia (defects with 2.5x3.2 mm Ø) of 80 male rats (250 grams). The surgical sites were rinse with 5%tranexamic acid solution in Groups III, IV, VII and VIII. In addition, were filled with fibrin adhesive into Groups II, IV, VI and VIII. The animals were euthanized at 45 days postoperative. The pieces were processed in methyl methacrylate (Stevenel's blue/Alizarin red). The samples were retrieved for bone-to-implant contact (BIC) and bone area fraction occupancy (BAFO) analyses. BIC and BAFO analysis showed higher values for G8 compared with G1 (p<0.05). There was no statistical difference among all other experimental groups for both BIC and BAFO analysis. The results of this study suggest that

association fibrin adhesive/ tranexamic acid had a positive effect on bone formation around implants with anodized surface and installed with compromised primary stability.

Descriptors: dental implants, osseointegration, surface properties.

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática do processo de anodização eletroquímico	30
Figura 2. Possíveis morfologias após anodização	31
Figura 3. Célula Eletroquímica	39
Figura 4. Implante Usinado	40
Figura 5. Implante após Anodização	41
Figura 6. Antissepsia	42
Figura 7. Acesso Cirúrgico	42
Figura 8. Confecção da loja óssea	42
Figura 9. Sutura (A)	42
Figura 10. Sutura (B)	42
Figura 11. Tíbia embutida em resina acrílica (A)	43
Figura 12. Tíbia embutida em resina acrílica (B)	43
Figura 13. Ilustração esquemática dos parâmetros histomorfométricos a serem analisados	44
Figura 14. Imagem de SEM/FEG da superfície do implante usinado (56X)	46
Figura 15. Imagem de SEM/FEG da superfície do implante anodizado (9 386X)	46
Figura 16. Imagem de SEM/FEG da superfície do implante anodizado (48 282X)	47
Figura 17. Imagem de SEM/FEG da superfície do implante anodizado (50 846X)	47
Figura 18. Imagens de SEM/FEG da superfície do implante anodizado (150 181X)	48

Figura 19. Imagens de SEM/FEG da superfície do implante anodizado mostrando diâmetro dos nanotubos (150 181X).	48
Figura 20A. Grupo I – Implante usinado/Controle – 60 dias	50
Figura 20B. Grupo I – Implante usinado/Controle – 60 dias	50
Figura 20C. Grupo I – Implante usinado/Controle – 60 dias	50
Figura 21A. Grupo II – Implante usinado/Adesivo Fibrínico – 60 dias	50
Figura 21B. Grupo II – Implante usinado/Adesivo Fibrínico – 60 dias	51
Figura 21C. Grupo II – Implante usinado/Adesivo Fibrínico – 60 dias	51
Figura 22A. Grupo III – Implante Usinado/Ácido Tranexâmico – 60 dias	51
Figura 22B. Grupo III – Implante Usinado/Ácido Tranexâmico – 60 dias	51
Figura 22C. Grupo III – Implante Usinado/Ácido Tranexâmico – 60 dias	52
Figura 23A. Grupo IV – Implante usinado/Adesivo Fibrínico/Ácido Tranexâmico – 60 dias	52
Figura 23B. Grupo IV – Implante usinado/Adesivo Fibrínico/Ácido Tranexâmico – 60 dias	52
Figura 23C. Grupo IV – Implante usinado/Adesivo Fibrínico/Ácido Tranexâmico – 60 dias	52
Figura 24A. Grupo V – Implante Anodizado – 60 dias	53
Figura 24B. Grupo V – Implante Anodizado – 60 dias	53
Figura 24C. Grupo V – Implante Anodizado – 60 dias	53
Figura 25A. Grupo VI – Implante Anodizado/Adesivo Fibrínico – 60 dias	53
Figura 25B. Grupo VI – Implante Anodizado/Adesivo Fibrínico – 60 dias	54
Figura 25C. Grupo VI – Implante Anodizado/Adesivo Fibrínico – 60 dias	54
Figura 26A. Grupo VII – Implante Anodizado/ Ácido Tranexâmico – 60 dias	54

Figura 26B. Grupo VII – Implante Anodizado/ Ácido Tranexâmico – 60 dias	54
Figura 26C. Grupo VII – Implante Anodizado/ Ácido Tranexâmico – 60 dias	55
Figura 27A. Grupo VIII – Implante Anodizado/ Adesivo Fibrínico/Ácido Tranexâmico – 60 dias	55
Figura 27B. Grupo VIII – Implante Anodizado/ Adesivo Fibrínico/Ácido Tranexâmico – 60 dias	55
Figura 27C. Grupo VIII – Implante Anodizado/ Adesivo Fibrínico/Ácido Tranexâmico – 60 dias	55

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Material para preenchimento do defeito ósseo	39
Tabela 2 – Grupos experimentais	40
Tabela 3. Percentual de contato osso/implante	56
Tabela 4. Percentual de área óssea dentro dos limites das roscas do implante	56

Lista de Gráficos

Lista de Gráficos

- Gráfico 1.** Diferenças entre os postos das médias ((Kruskal-Wallis)) para o percentual de contato osso/implante 56
- Gráfico 2.** Diferenças entre os postos das médias ((Kruskal-Wallis)) para o percentual de área óssea dentro dos limites das roscas do implante 57

Sumário

Sumário

Introdução	25
Proposição	34
Material e Método	36
Resultados	45
Discussão	58
Conclusão	62
Referências	64

Introdução

Introdução

Ancoragem primária diminuída e retardo e/ou deficiência do processo de osseointegração podem ocorrer quando implantes são instalados imediatamente após a extração dentária. Isto se dá em razão da ampla interface entre as paredes circundantes do alvéolo e a superfície do implante ^{27,35}. Vários estudos têm avaliado a macro e microgeometria dos materiais, bem como técnicas e instrumentação cirúrgica na tentativa de promover o preenchimento ósseo do defeito sob o ponto de vista clínico, mecânico e biológico, garantindo, além de melhor contorno alveolar, previsibilidade no processo de osseointegração ^{9,10,18,24,31,38}. Substitutos ósseos homogêneos e aloplásticos vêm sendo usados a fim de melhorar as condições do leito cirúrgico e o processo de reparação em casos específicos como sobrefresagem, fenestrações, baixa densidade óssea e complementação alveolar pós-exodontia ^{3-6,8, 13, 21, 35}. Também a modificação na morfologia da superfície do implante que mimetize a arquitetura do tecido natural por meio da anodização tem demonstrado melhorar as interações celulares e promover a formação de tecido saudável ^{2,48,58}.

Dentre os substitutos aloplásticos incluem-se as biocerâmicas à base de sais de fosfato de cálcio, polímeros e produtos à base de colágeno e fibrina ^{11,12,14,21,22,24,32,43,55,60-63}.

Os adesivos fibrínicos, também conhecidos como selantes de fibrina e cola de fibrina são produtos não citotóxicos, oriundos de proteínas do plasma humano, que mimetizam a via final da rede de coagulação ^{1,4,26,30,37}. Nesses produtos, o fibrinogênio é proteoliticamente clivado e convertido em polímeros de fibrina pela ação da trombina. O Fator XIII, quando ativado pela trombina na presença de cálcio, reage com os polímeros de fibrina resultando em coágulo estável, insolúvel e semelhante ao coágulo fisiológico ¹. A lise prematura do coágulo é impedida pela presença de aprotinina, um inibidor da fibrinólise ^{1,4,43}. O selante de fibrina tem boa tolerabilidade e raríssimos casos de eventos adversos têm sido relatados ^{1,50}. Estes materiais são utilizados em diferentes campos cirúrgicos como agentes hemostáticos e indutores de processo de cicatrização ^{4,41}.

Perka e colabs.⁴³ (2000) demonstraram efeito positivo do adesivo fibrínico associado a células do periósteo na formação de tecido ósseo em coelhos após 28 dias de observação. Resultados semelhantes foram encontrados por Isogai e colabs.²⁶ em camundongos após 12 semanas de observação. Abiraman et colabs.¹ observaram propriedades osteoindutoras para a combinação de grânulos de hidroxiapatite/vidro bioactivo/adesivo fibrínico, Yamada e colabs.⁶¹ para a associação β -TCP/adesivo fibrínico e You e colabs.⁶² para adição do material ao plasma rico em plaquetas. Hermeto e colabs.²³ demonstraram melhor comportamento do adesivo fibrínico Tissucol® em comparação ao plasma rico em plaquetas em situações de enxerto cutâneos de espessura completa em cães.

O material é considerado *scaffold* por vários autores, em razão de servir como arcabouço e /ou ancoragem para fixação e crescimento celular⁵⁴. Ten Hallers e colabs.⁵⁴ propuseram a estabilização imediata de implantes de titânio por meio de adesivo fibrínico/malha de polipropileno com base nos resultados de seus estudos em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, os quais apontaram ausência do material em 12 semanas de observação.

Furst e colabs.²² lembram que as principais características de fibrina são elevada resistência à tração, força adesiva, biocompatibilidade e reabsorção. Um grande evento adverso seria prematura lise de fibrina e hemorragia recorrente, o que pode ser evitado por inibidores de fibrinólise, tais como ácido epsilon aminocaproico e ácido tranexâmico. Já em 2003 Cox e colabs.¹⁵ propunham concentrações inferiores a 300mM de solução de ácido tranexâmico para coibir lise do coágulo de fibrina formado a partir da reconstituição do adesivo fibrínico. A quebra da fibrina pela ação da plasmina é a base da fibrinólise^{4,42}. Durante a coagulação sanguínea, a rede de fibrina formada estabiliza o tampão plaquetário. Essa fase pode ser dividida em duas vias: via intrínseca (ou via do fator de contato) e via extrínseca (ou via do fator tecidual), embora ocorra a participação de fatores nas duas vias simultaneamente. É importante ressaltar que *in vitro* a ativação da coagulação pode ocorrer por qualquer uma dessas vias. A via extrínseca é ativada quando o fator tecidual é exposto devido à lesão vascular, fase em que participam o fator V e o fator X e é chamada de via comum ou fase final da cascata de coagulação, cujo objetivo é formar trombina. Atualmente é aceito que o

início da coagulação ocorre quando o fator tecidual é exposto ao espaço intravascular após a lesão do endotélio ou pela liberação de citocinas. Esse fator liga-se ao fator VII ativado (Fator VIIa) que corresponde a 1% de todo fator VII circulante. O complexo fator tecidual/fator VIIa ativa os fatores IX e X, o qual, por sua vez, ativa a Fator V, e também formam um complexo que tem como resultado final a formação de pequena quantidade de trombina. Essa trombina formada é capaz de ativar plaquetas, fator VIII, fator V e fator XI. A superfície da plaqueta ativada servirá como local onde o complexo Fator VIIIa/Fator IXa ativa o fator X com eficiência 50 vezes maior que o complexo Fator Tecidual-Fator VIIa. O Fator Xa liga-se ao Fator Va em outro local da superfície plaquetária formando o complexo protrombinase, que é capaz de formar grandes quantidades de trombina a partir do Fator Xa. A trombina, por sua vez, converterá fibrinogênio em fibrina, promovendo a ativação plaquetária e ativando o fator XIII, responsável pela polimerização da fibrina e da maior resistência do coágulo. Outra via de coagulação sanguínea envolve o fator XII, cininogênios de alto peso molecular, précalicreína e fator XI com posterior ativação do fator IX. A importância dessa via ainda não é bem entendida, porque a deficiência do fator XII não provoca alteração da coagulação. No entanto, a deficiência do fator XI pode ocasionar problemas moderados de sangramento¹⁶. Segundo Roberts e cols.⁴³ a deficiência do fator XI ocasiona alterações da coagulação de pequena importância clínica. A fibrinólise se antagoniza à coagulação. Participam dela o plasminogênio e o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA), protease que transforma o plasminogênio em plasmina. Devido ao fato de ser uma enzima proteolítica de amplo espectro, a plasmina digere fibrina, fibrinogênio e a maioria dos fatores e co-fatores de coagulação²⁴. A fibrina é estabilizada com formação de ligações cruzadas pela ação do fator XIII. A lise do coágulo antes da formação das ligações cruzadas origina os produtos de degradação da fibrina e do fibrinogênio (PDF). A lise do coágulo após a estabilização da fibrina origina os D-dímeros^{4,5,43}.

Os antifibrinolíticos inibem a fibrinólise e, conseqüentemente, impedem ou diminuem a formação dos produtos de degradação da fibrina e do fibrinogênio, que têm ação deletéria sobre a função plaquetária³⁶. Além dessa ação, diminuem a conversão do plasminogênio em plasmina, que tem atividade proteolítica nos receptores plaquetários. Atualmente, são três os agentes

antifibrinolíticos mais empregados: um inibidor de proteases séricas de amplo espectro, a aprotinina, e dois análogos do aminoácido lisina, com fórmulas estruturais semelhantes e inibidores da fibrinólise: ácido tranexâmico e ácido épsilon aminocapróico. O ácido tranexâmico é de seis a dez vezes mais potente que o ácido épsilon aminocapróico^{19, 25, 33}, além de apresentar maior afinidade pelo plasminogênio, maior atividade antifibrinolítica e maior tempo de ação. A atividade antifibrinolítica se deve à formação de complexos reversíveis com o plasminogênio. O ácido tranexâmico bloqueia quase completamente a interação entre o ativador tecidual do plasminogênio, o plasminogênio e o monômero de fibrina em virtude da alta afinidade pelos locais de ligação da lisina do plasminogênio²⁵. Esse processo inibe ou retarda a fibrinólise porque a plasmina, embora formada, não consegue se ligar à fibrina.

A ativação da cascata de coagulação é imediata à implantação de biomateriais em tecidos duros e moles e seu contato com sangue. Atribui-se à trombogenicidade do titânio papel decisivo na sua osseointegração, de modo que a interação das células sanguíneas e plaquetas com a superfície dos implantes dentários irá determinar todo o processo de osseointegração^{3,9}.

Alves-Rezende e Okamoto⁴ observaram controle da fibrinólise provocada pelo estresse quando alvéolos dentários receberam associação Tisscol/ácido epsilon-aminocapróico. Esses resultados foram corroborados por Okamoto e cols.⁴⁰ em defeitos críticos em tíbias de ratos. Alves-Rezende e cols.³ observaram em ratos favorecimento da geração do coágulo sanguíneo, formação óssea e osseointegração pela ação do ácido tranexâmico, aumentando a capacidade osteogênica dos implantes de titânio CP.

O ácido tranexâmico é livremente solúvel em água. Uma solução a 5% possui pH entre 6,5 e 8. Uma formulação líquida comercial é disponível em alguns países, mas não no Brasil. O Ácido Tranexâmico a 5% é algumas vezes prescrito para lavagem da cavidade bucal após exodontias ou na forma de pasta. Para o preparo da solução um comprimido de 500 mg triturado é misturado a soro fisiológico e filtrados os excipientes insolúveis para resultar em solução límpida. Para o preparo da pasta um comprimido de 500mg deve ser macerado e colocado em gaze ou mesmo diretamente sobre a ferida cirúrgica³⁹.

Também a estabilidade primária em implantodontia, isto é, o contato inicial do osso com o implante conseguido mecanicamente, responde diretamente pelas taxas de sobrevivência do implante^{17,18,27,29,34,53,56}. Neste processo, o tratamento de superfície joga papel fundamental promovendo alterações químicas e mudanças micromorfológicas capazes de estimular a osseointegração^{40, 57}.

Ballal e cols.⁶ lembram que a superfície dos implantes anodizados apresentam maior grau de oxidação e de energia de superfície. A melhora considerável da biocompatibilidade^{2, 53,58} pode ser inferida pela maior adesão de osteoblastos^{10,39}.

O processo de anodização consiste na deposição de filme de óxido na superfície do metal por meio de imersão em ambiente eletrolítico^{39,48,58,59}. Na célula eletroquímica, o metal que se deseja anodizar é ligado ao pólo positivo da fonte de corrente contínua transformando-se no anodo da cuba eletrolítica. O catodo é ligado ao pólo negativo e ele pode ser uma placa ou barra, de platina, grafite ou qualquer outro metal condutor que não reaja com o banho de anodização. O anodo é o eletrodo para onde se dirigem os ânions e o catodo o eletrodo para onde vão os cátions. Quando o circuito é fechado ocorre uma reação de oxidação ($M \rightarrow M^{n+} + ne^-$), conforme representação esquemática abaixo⁴⁸.

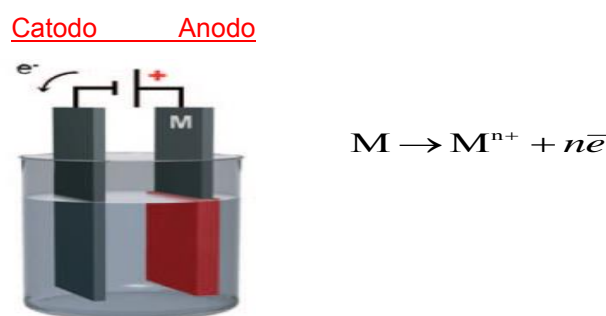


Figura 1. Representação esquemática do processo de anodização eletroquímico.

Dependendo do eletrólito e dos parâmetros de anodização essencialmente três possibilidades de reações podem existir (Figura 2):

- I. os íons M^{n+} no eletrólito, isto é, o metal é continuamente dissolvido (corrosão);

II. os íons M^{n+} formados reagem com O^{2-} (fornecido pela água presente no eletrólito) e formam uma camada de óxido compacta (MO), se MO não é solúvel no eletrólito;

III. sob algumas condições eletroquímicas é estabelecida uma competição entre a solvatação e formação do óxido, levando à formação de uma camada de óxido (MO) porosa. Sob condições experimentais mais específicas ocorrerá a auto-organização dos poros durante o crescimento;

IV. Além disso, poderá também ocorrer o crescimento rápido desordenado de nanotubos ou ainda a formação de camadas auto organizadas de mesoporos.

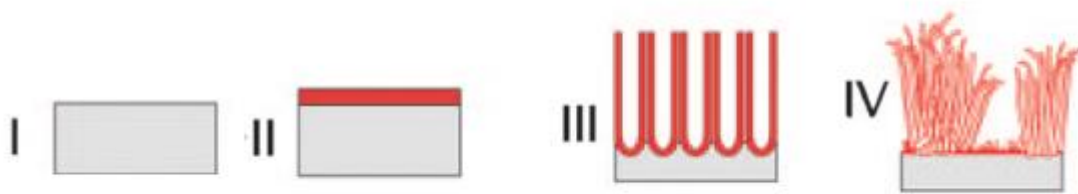


Figura 2. Possíveis morfologias após anodização: (I) metal eletropolidado; (II) formação de camada de óxido compacta; (III) formação de nanotubos ou nanoporos auto-organizados; (IV) nanotubos desordenados⁴⁸.

Existem diversas técnicas e diversos eletrólitos para produzir nanotubos de TiO_2 por anodização. Os eletrólitos são formados tipicamente por soluções contendo íons fluoreto, por exemplo. O titânio contém uma camada passiva estável em superfície que o protege contra a corrosão. Quando essa camada é danificada ela é reconstruída rapidamente em contato com ar ou água. Esta reação produz TiO_2 bem como gás hidrogênio de acordo com a seguinte reação (Equação 1):



Se esta superfície entra em contato com solução aquosa contendo fluoreto o mecanismo de formação dos nanotubos ocorre de acordo com a equação 2:



Neste processo, uma camada intermediária $[TiF_6]^{2-}$ é formada na superfície do titânio em solução contendo fluoreto obedecendo as seguintes etapas: 1) formação de uma camada compacta de TiO_2 ; 2) formação de camada de poros uniformemente distribuídos e 3) formação de nanotubos⁵¹.

Parâmetros da solução eletrolítica como concentração de HF, pH e quantidade de água assim como as condições eletroquímicas, como tensão e tempo, determinam a morfologia e a estrutura da camada porosa/ tubular durante o processo de anodização do titânio e outros metais de transição^{2, 28}.

A primeira geração de nanotubos de TiO₂ utilizava eletrólito de HF ou misturas de HF produzindo camada de óxido com até 500-600 nm. Eletrólitos tamponados neutros contendo NaF ou NH₄F foram usados na segunda geração substituindo HF e, levando-se em consideração a importância do gradiente de pH dentro do tubo, foi possível o crescimento de nanotubos de TiO₂ com espessura superior a 2 µm. Na terceira geração, nanotubos foram fabricados em eletrólitos quase sem água. Neste tipo de eletrólitos com glicerol foi possível crescer nanotubos com paredes retas e comprimento de mais de 7 µm^{48,49,53}.

Baron e cols.⁷ avaliaram a formação de nanotubos em TiCP quando anodizado em soluções com glicerol e 0.5 % (m/m) NH₄F encontrando paredes tubulares lisas, homogêneas e com grande razão entre comprimento e diâmetro

Feng e cols.²⁰ pesquisaram o efeito da adição de maior quantidade de água no eletrólito H₂SO₄ + HF. A água deionizada foi acrescentada substituindo em 85% a quantidade de HF com o objetivo de diminuir o impacto da reação eletroquímica. Com uma tensão de 15V e tempo de 30 min os autores obtiveram uma estrutura tubular homogênea e 240 nm de comprimento.

O tempo empregado no processo de anodização no qual o metal fica submetido às reações químicas com o eletrólito e a tensão também exercem influência no comprimento do nanotubo².

A tensão aplicada ao processo de anodização influencia de maneira direta no comprimento dos nanotubos formados. De acordo com estudos realizados por Allam e cols.² tensão elevada aplicada em eletrólitos orgânicos levam a formação de nanotubos com maior comprimento e espessura da ordem de 19 µm.

Valores de tensão do processo de anodização entre 30V- 40V proporcionaram maiores diâmetros de nanotubos, porém a proporção água/acido fluorídrico também foram fatores determinantes na organização de nanotubo^{2,7}.

Wei e colabs.⁵⁸ investigaram o processo de anodização alterando o eletrólito e a tensão. Foi utilizado eletrólito contendo glicerol menos de 0.1%(m/m) de H₂O com NH₄F. Nestas condições eles variaram a tensão entre valores de 10 até 50V os resultados encontrados mostraram que o diâmetro do poro na camada porosa aumentou quando a tensão estava na faixa de 10-20V. O maior valor de diâmetro encontrado foi com o valor de tensão de 20V. Nos valores de tensão entre 20V e 50V o diâmetro do poro diminui conforme aumentou a tensão. Estes resultados demonstraram a estreita relação de dependência entre a tensão e o diâmetro do poro formado no processo de anodização.

Ruck e colabs.⁴⁴ fabricaram nanotubos ordenados em eletrólito contendo H₂SO₄ + HF + DMSO durante 20 min. Neste experimento variou-se a tensão obtendo diferentes comprimentos de nanotubos, sendo para 10 V - 2,3µm, 12V- 7,5 µm e para 15V- 11,1 µm. Demonstrando assim a íntima relação entre tempo de anodização e comprimento do nanotubo.

Visto que os estudos experimentais associando implantes revestidos por nanotubos, instalados sem estabilidade primária e associados à adesivo fibrínico/ácido tranexâmico inexistem na literatura, justifica-se o presente trabalho e a investigação do reparo ósseo após a instalação de implantes de TiCp revestidos por nanotubos em ratos, em situação de ausência de estabilidade primária e associados a adesivo fibrínico/ácido tranexâmico.

Proposição

Proposição

O propósito deste trabalho foi avaliar o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio recobertos com nanotubos, associados à adesivo fibrínico/ácido tranexâmico e instalados sem estabilidade primária.

Material e Método

Material e Método

1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi submetido à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA-FOA 00634-2013) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), seguindo os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Soma-se à preocupação com bem estar dos animais de acordo com a Lei no. 5.517 de 23 de outubro de 1968, artigo 5o; Lei no. 6.638 de 08 de maio de 1979; à resolução no. 592 de 26 de junho de 1992 e Projeto de Lei no. 9.605/1998 e no. 1. 691/2003. A Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) segue as propostas legais do COBEA, Sociedade Civil de caráter científico-cultural, sem fins lucrativos, de duração indeterminada, com sede e foro na cidade de São Paulo, constituída por pesquisadores e técnicos interessados em experimentação animal.

2. PARADIGMA E MODELO DE PESQUISA

A investigação foi desenvolvida dentro do paradigma tradicional, quantitativo e qualitativo, por meio de abordagem experimental, após sua metodologia ser avaliada e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP (CEUA-FOA 00634-2013)

3. PROBLEMA

O reparo ósseo ao redor de implantes de titânio CP instalados sem estabilidade primária é dependente da modificação da superfície do implante (nanotubos) e de sua associação a adesivo fibrínico e/ou ácido tranexâmico?

4. HIPÓTESES

- O reparo ósseo ao redor de implantes de titânio CP instalados sem estabilidade primária independe da modificação da superfície do implante (nanotubos) e de sua associação a adesivo fibrínico e/ou ácido tranexâmico.

- O reparo ósseo ao redor de implantes de titânio CP instalados sem estabilidade primária é favorecido pela modificação da superfície do implante (nanotubos) e de sua associação a adesivo fibrínico e/ou ácido tranexâmico.

5. USINAGEM E ANODIZAÇÃO DOS IMPLANTES

O objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio de análise histomorfométrica em ratos, o reparo ósseo ao redor de implantes instalados sem estabilidade primária, revestidos por nanotubos e associados a adesivo fibrínico e/ou ácido tranexâmico. Para o estudo foram confeccionados 80 implantes de *Titânio* ASTM F67 (*Grau* 4), com dimensões de $\varnothing 2.1 \times 2.8$ mm (Figura 4), usinados em torno CNC STAR®, modelo SR-20RII, com potência de 2,2 kW. Foi empregada ferramenta de roscamento externo ISCAR® 16 ER 0.80 ISO IC 908 (metal duro revestido com TiNAl) e fluido de corte ECOCUT 910 (FUCHS®) em abundância. Para anodização eletroquímica foi utilizado o meio Glicerol-H₂O DI (50-50 v/v) + NH₄F com concentração variando de 0,5 a 1,5 % em massa, tensão de 10 a 30V, tempo de 1 a 3 horas, sob agitação mecânica (barra magnética imersa no eletrólito com agitação de 250 rpm) e em temperatura ambiente. O catodo foi uma folha de platina e o eletrodo de trabalho titânio grau II. Ao término do processo os implantes foram lavados três vezes em álcool isopropílico e secos com ar comprimido livre de óleo. Na sequência foram calcinados em forno resistivo a 530°C (1°C/min) por um período de 3 horas. A superfície dos implantes foi observada por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (SEM/FEG) para verificar a presença de nanotubos, sua distribuição e morfologia. Após essa etapa foram esterilizados a uma dose de 25 kGy por meio de radiação gamma (⁶⁰Co, Gammacell modelo 220 do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN).

Na Figura 3 é possível observar a configuração da célula eletroquímica empregada nesse estudo. A Figura 5 exhibe o aspecto do implante após anodização.

6. MATERIAL PARA TRATAMENTO/PREENCHIMENTO DA LOJA CIRÚRGICA

Os materiais que foram utilizados no experimento para preenchimento da cavidade cirúrgica (defeito ósseo) estão elencados na Tabela 1. O ácido tranexâmico foi utilizado em solução a 5%. Para tanto um comprimido de 500 mg foi triturado e diluído em 100ml de soro fisiológico. A solução foi

duplamente filtrada. Para a armazenagem e manipulação desses materiais foram obedecidas as recomendações do fabricante.

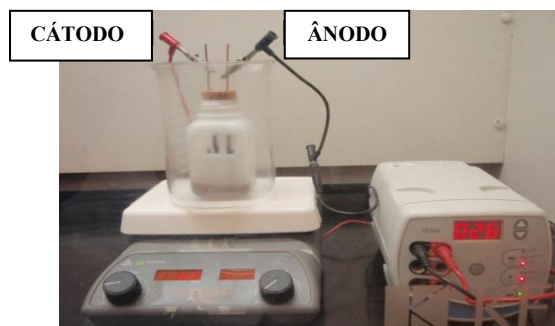


Figura 3. Célula Eletroquímica.

Tabela 1 – Material para preenchimento do defeito ósseo.

MATERIAL	COMPOSIÇÃO	FABRICANTE
Tissucol®	Fibrinogênio, trombina, aprotinina, cloreto de cálcio	Immuno SA
Transamim®	$C_8H_{15}NO_2$	Nikkho SA

7. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

O experimento utilizou 80 (n=10) ratos machos com peso entre duzentos e cinquenta e trezentos gramas, da espécie *Rattus norvegicus*, ordem *Rodentia*, linhagem *Wistar*, distribuídos aleatoriamente em dois grupos, com 40 animais cada, e estes subdivididos em três grupos. Os grupos foram nomeados da seguinte forma: I, II, III...VIII (tabela 2).

Durante todo o experimento, os animais permaneceram alojados em gaiolas plásticas padronizadas (39x32x16cm) com forração de maravalha (estéril) e mantidos em temperatura controlada de aproximadamente 21 graus centígrados, com ciclo de luz claro-escuro de 12 horas (luz de 6:00 às 18:00 horas), tendo água e ração à vontade. Todos os experimentos foram realizados entre 07:30 e 09:30 horas, com objetivo de minimizar as influências circadianas. Os procedimentos de manipulação, alimentação e limpeza foram realizados seguindo rotina habitual. O material de

consumo utilizado foi lâmina de bisturi nº 15, fios de sutura mononylon 4.0, campos estéreis, clorexidina 0,12 %, solução fisiológica 0,9 %, seringas estéreis de 20 ml e gazes estéreis.

Tabela 2 – Grupos experimentais.

GRUPO	Nº ANIMAIS	TRATAMENTO
GRUPO I	10	Usinado
GRUPO II	10	Usinado/ Adesivo fibrínico (Tissucol)
GRUPO III	10	Usinado/Ácido Tranexâmico
GRUPO IV	10	Usinado/ Adesivo fibrínico (Tissucol)/Ácido Tranexâmico
GRUPO V	10	Anodizado
GRUPO VI	10	Anodizado/ Adesivo fibrínico (Tissucol)
GRUPO VII	10	Anodizado/ Ácido Tranexâmico
GRUPO VIII	10	Anodizado/ Adesivo fibrínico (Tissucol)/Ácido Tranexâmico

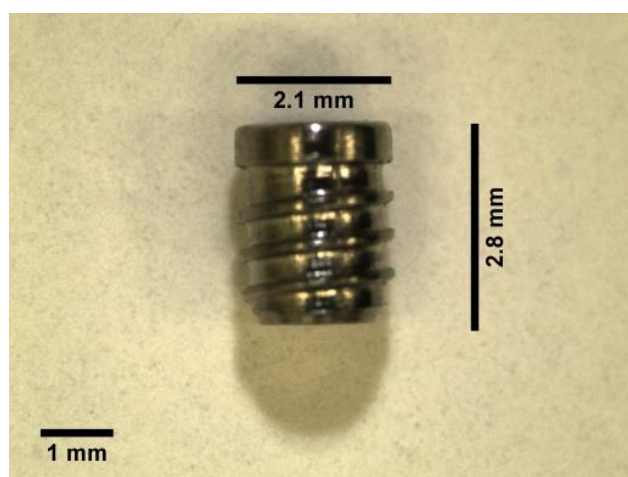


Figura 4. Implante Usinado.

O instrumental cirúrgico utilizado constou de cabo de bisturi nº 3, descoladores de Freer e Molt, pinça anatômica, pinça Adson, porta-agulha tipo Castroviejo, pinça de titânio, kit adaptado para colocação dos implantes (broca piloto e chave para posicionamento e inserção), contra-ângulo redutor 16:1, modelo 3624 N marca Kavo® e motor marca Driller® Modelo BLM 600 Plus. O procedimento cirúrgico foi realizado de acordo com metodologia proposta por de Oliveira e colabs.¹⁸, sob anestesia geral com Cloridrato de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil LTDA – Osasco, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Ketamina (Vetaset – Fort Dodge, Saúde Animal

LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil) na dose de 40-80 mg/kg Ketamina para 5-10 mg/kg de Xilazina, via intraperitoneal. Após a indução anestésica a tibia direita foi tricotomizada em sua porção ventral, higienizada com gaze e solução fisiológica a 0,9 % e a antissepsia da região foi realizada com Clorexidina 0,12 %. O animal foi posicionado em decúbito dorsal e o local de eleição para a incisão foi estabelecido pela porção mais volumosa do tecido ósseo, por meio de palpação, sendo realizada com cabo de bisturi nº 3, montado com lâmina nº 15. Para o descolamento, utilizou-se, além da pinça de Adson com dente, os descoladores de Freer e de Molt. Esses mesmos instrumentos, juntamente com pinça anatômica auxiliaram no afastamento do retalho e estabilização da tibia. A secagem do campo operatório foi realizada com gaze estéril. O preparo do local para a inserção do implante foi realizado com broca em baixa rotação, montada em contra-ângulo redutor (16:1) e, ligado ao motor elétrico (velocidade de 1200 rpm e um torque de 35 N/cm). A perfuração da tibia foi realizada em apenas um estágio (broca única/Ø2.5x3.3mm comprimento). delimitada por lima endodôntica, previamente calibrada, com o seu cursor em 3,3 mm. A refrigeração foi realizada através de irrigação copiosa com solução fisiológica a 0,9 %. O implante, após ser removido do grau cirúrgico estéril por meio de pinça de titânio foi levado ao local da sua instalação. Obedeceu-se ao preparo prévio da loja cirúrgica de acordo com o grupo ao qual o animal pertencia (Tabela 2).

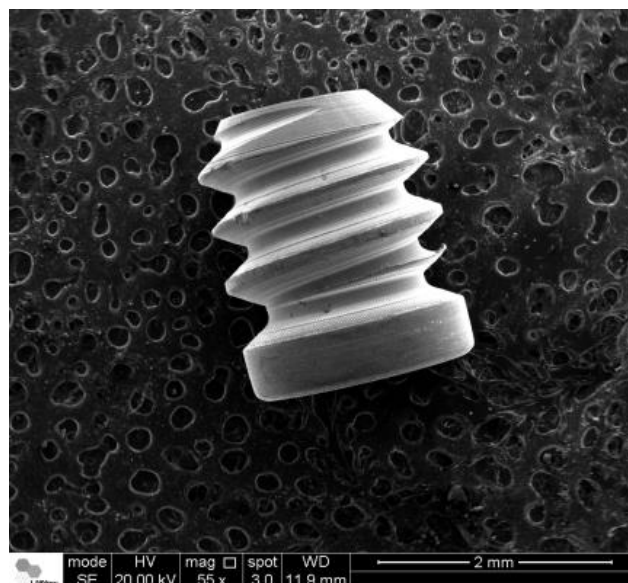


Figura 5. Implante após Anodização.

O ato operatório foi finalizado com o fechamento primário dos tecidos, por meio de suturas simples, com fio nylon 4-0, montado em agulha atraumática, semicircular, de 1,5 cm de comprimento, secção triangular, por planos e com auxílio de pinça Adson (Figuras 6 a 10).



Figura 6. Antissepsia. **Figura 7.** Acesso cirúrgico. **Figura 8.** Confecção da loja óssea.



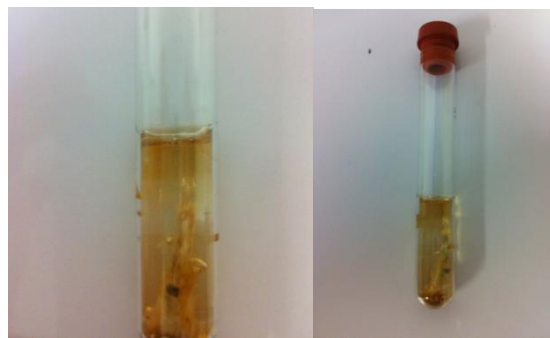
Figuras 9 e 10. Sutura.

8. EUTANÁSIA E COLETA DO MATERIAL

Os animais foram anestesiados por infiltração intramuscular de 50mg/kg de Ketamina (Vetaset – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5 mg/kg de cloridrato de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil LTDA – Osasco, São Paulo, Brasil). Foi realizada a eutanásia por meio de perfusão no ventrículo esquerdo de solução salina fisiológica a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) por 10 (dez) minutos, e em seguida de Formaldeído 4% (Paraformaldeído 4% - Acros Organics) durante 40 minutos, usando bomba perfusora peristáltica (Masterflex[®] Ls, Cole – Parmer Instrument Company), decorridos 60 dias após a instalação dos implantes. As tíbias direitas foram removidas e o tecido mole excedente eliminado.

Os segmentos ósseos contendo os implantes provenientes das tíbias direitas foram imersos em solução de formalina 10%, tamponados com Cacodilato de Sódio 0,1 M (pH 7,3) por 48 horas e transferidos para solução de etanol 70%, onde permaneceram imersos por 72 horas. A seguir foram

desidratados por concentrações graduais de álcoois e imersos em resina (LR White Hard Grade, Londres) em tubo de ensaio com 15 mm de diâmetro e levados para polimerizar em estufa para cultura bacteriológica Fanem 502 (Laboratório de Biomateriais/Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp) com temperatura controlada em $37^{\circ}\text{C} \pm 1$. Após polimerização (Figuras 11 e 12) da resina acrílica os tubos de ensaio foram quebrados para remoção dos blocos de resina contendo as tíbias, os quais foram fatiados em três porções acompanhando o longo eixo do implante em cortadora metalográfica de precisão. Posteriormente cada fatia foi lixada progressivamente em politriz até atingir $40\ \mu\text{m}$ de espessura. Na sequência foram coladas em lâmina de vidro (Araldite®), lixadas manualmente até espessura de $10\ \mu\text{m}$ e coradas com vermelho de alizarina e azul de Stevenel para posterior análise histológica e histomorfométrica.



Figuras 11 e 12. Tibia embutida em resina acrílica.

Os espécimes preparados para a análise histológica foram visualizados em microscópio óptico de luz (Olympus BX41 TF, Japão). As imagens obtidas foram fotografadas por meio de câmera digital Cool Snap-Pro (Media Cybernetics, EUA) acoplada ao microscópio (Laboratório de Endodontia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp). A obtenção de imagem foi realizada por meio do programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, EUA). As fotomicrografias foram realizadas na objetiva em $40\times$ e em $100\times$ e a captação das imagens foram individuais para cada rosca, nas quatro primeiras roscas do implante. As fotomicrografias foram arquivadas para a posterior análise histomorfométrica.

Para a análise histomorfométrica foram avaliadas as porcentagens de contato osso-implante e a área óssea, entre as 4 roscas principais mais superficiais dos implantes, em ambos os lados. As

aferições foram realizadas por um único avaliador, utilizando-se software analisador de imagens - Image Tool, versão 3,0 (EUA), conforme esquema abaixo. Este modelo seguiu o protocolo proposto por Sennerby et al.⁴⁶. A área óssea dentro dos limites da rosca do implante foi representada pela letra A. A extensão do contato osso-implante dentro dos limites da rosca foi representada pela letra B. A letra C representou os espaços ocupados pela medula óssea. Para facilitar a interpretação do contato osso-implante foi realizada em programa Adobe Photoshop 6.0 (EUA) a reconstrução das imagens em filtro raio de 5,8 pixels (Figura 13).

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística. O teste estatístico foi determinado após submeter os dados numéricos obtidos ao Teste de Normalidade e teve por objetivo testar a hipótese de que um ou mais grupos apresentaram padrão mais acelerado de osseointegração.

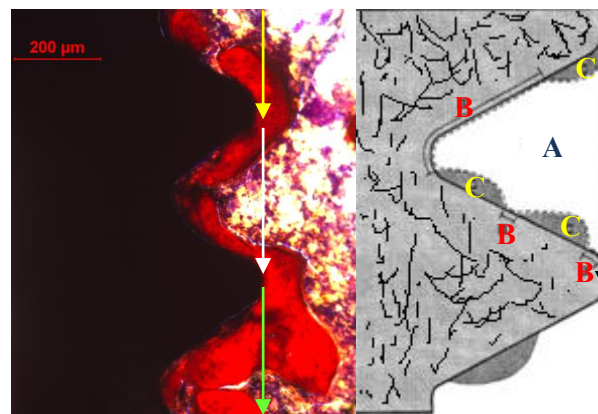


Figura 13. Ilustração esquemática dos parâmetros histomorfométricos a serem analisados. Em cada rosca (roscas de 1 a 4) em ambos os lados do implante a percentagem de área óssea e o contato osso/implante foram mensurados. A área óssea dentro dos limites da rosca do implante foi representada pela letra A. A extensão do contato osso-implante dentro dos limites da rosca foi representada pela letra B. A letra C representará os espaços ocupados pela medula óssea⁴⁶.

Resultados

Resultados

A topografia da superfície anodizada na qual cresceram os nanotubos foi avaliada comparativamente à superfície usinada por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV) de alta resolução (FEG-SEM)/Hitachi S-4700, Tóquio, Japão) (Figuras 14 a 19).

A Figura 14 exibe o aspecto característico da superfície usinada com as marcas de ranhuras decorrentes do processo de produção do implante por usinagem.

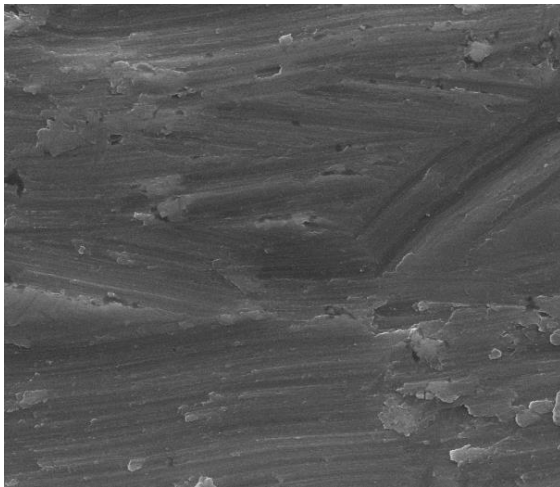


Figura 14. Imagem de SEM/FEG da superfície do implante usinado (56X).

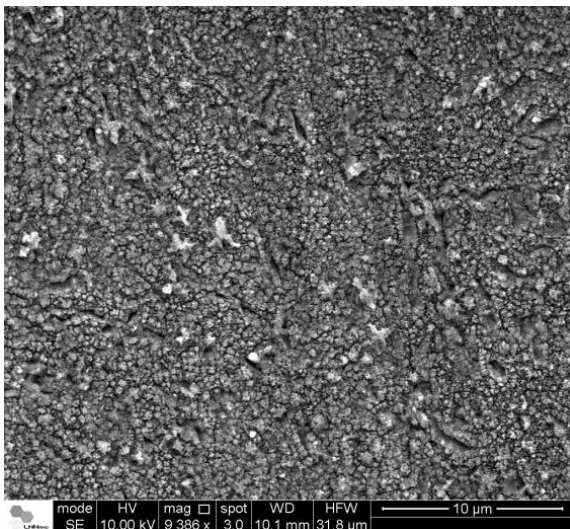


Figura 15. Imagem de SEM/FEG da superfície do implante anodizado (9 386X).

Nas Figuras 15 a 19 pode-se observar que a superfície anodizada apresenta topografia rugosa com muitos vales e picos arredondados densamente distribuídos de forma uniforme.

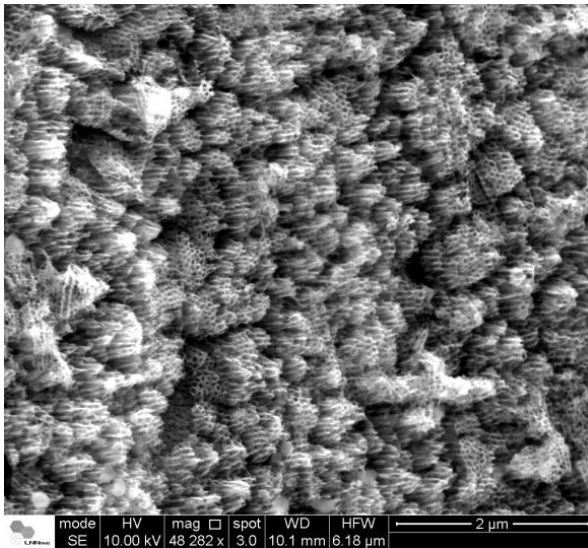


Figura 16. Imagem de SEM/FEG da superfície do implante anodizado (48 282X).

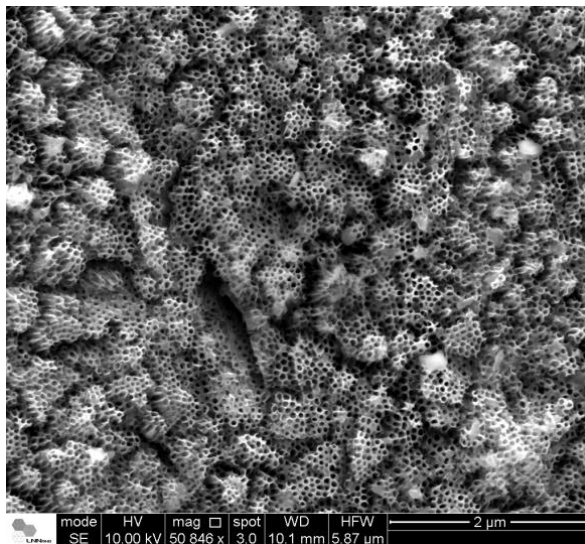


Figura 17. Imagem de SEM/FEG da superfície do implante anodizado (50 846X).

Os nanotubos crescidos após anodização da superfície mostraram diâmetro em torno de 50 nm e altura da camada de nanotubos ficou em torno de 1 μ m (Figura 19).

Neste trabalho foi estabelecido como problema se o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio CP instalados sem estabilidade primária era dependente da modificação da superfície do implante (nanotubos) e de sua associação a adesivo fibrínico e/ou ácido tranexâmico. Duas hipóteses foram testadas: 1) o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio CP instalados sem estabilidade primária independe da modificação da superfície do implante (nanotubos) e de sua associação a adesivo fibrínico e/ou ácido tranexâmico e 2) o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio CP

instalados sem estabilidade primária é favorecido pela modificação da superfície do implante (nanotubos) e de sua associação a adesivo fibrínico e/ou ácido tranexâmico.

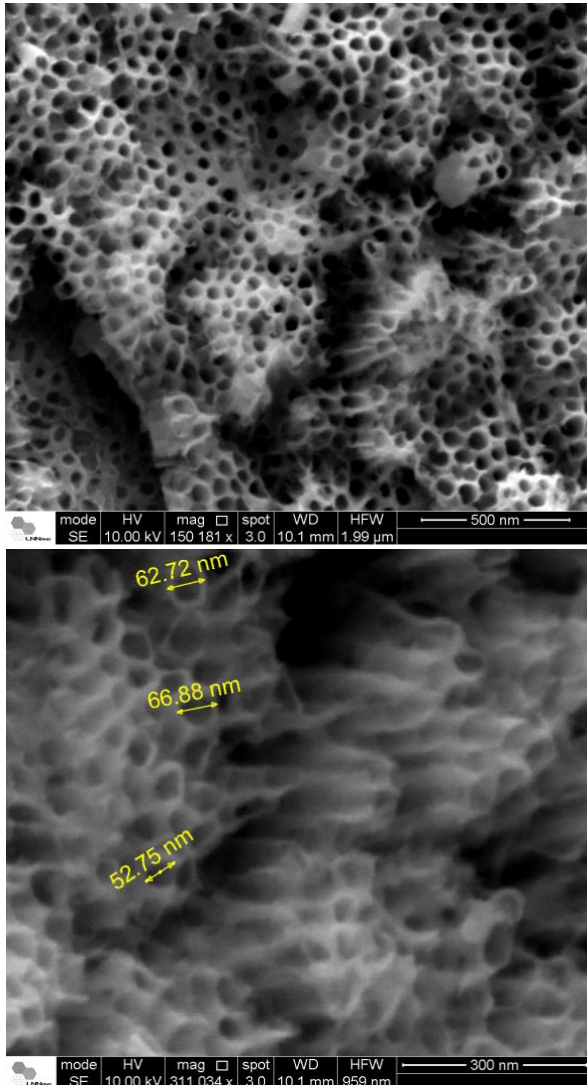


Figura 18. Imagens de SEM/FEG da superfície do implante anodizado (150 181X)

Figura 19. Imagens de SEM/FEG da superfície do implante anodizado mostrando diâmetro dos nanotubos (150 181X).

O reparo ósseo ao redor de implantes biomateriais foi analisado qualitativamente e quantitativamente em dois parâmetros distintos: (1) percentual de contato ossoimplante e (2) área de neoformação óssea produzida nas áreas abrangentes de cada rosca do implante dentário.

- **Análise Histológica Qualitativa**

Para todos os implantes avaliados, observou-se a formação de tecido ósseo ao redor dos implantes e ausência de tecido fibroso. Diferenças histológicas foram observadas entre os grupos que

receberam Adesivo Fibrínico (Tissucol)/Ácido Tranexâmico e os demais grupos, traduzidas por uma maior quantidade de trabéculas ósseas indicativos de aceleração do processo de formação óssea.

- **Percentual de contato osso-implante**

Para estabelecer o percentual entre o contato íntimo do osso neoformado e o implante foram realizadas mensurações lineares no perímetro do implante e contabilizadas tanto as medidas totais (das quatro roscas expostas) como a medida dos perímetros tangentes ao tecido ósseo (Figuras 17B, 18B, 19B, 20B, 21B, 22B, 23B e 24B).

Quando analisadas as médias percentuais de tecido ósseo tangente à rosca do implante os resultados deste trabalho identificaram diferenças estatísticas em razão da modificação da superfície do implante (nanotubos) e de sua associação a adesivo fibrínico e/ou ácido tranexâmico entre o Grupo I (Implante Usinado) e Grupo VIII (Implante Anodizado/ Adesivo Fibrínico (Tissucol)/Ácido Tranexâmico). As médias percentuais para cada grupo pode ser verificada na Tabela 1.

- **Área de tecido ósseo neoformado dentro dos limites da rosca do implante**

O segundo parâmetro avaliado neste trabalho refere-se ao percentual de área óssea total encontrada dentro dos limites das roscas do implante ((Figuras 17C, 18C, 19C, 20C, 21C, 22C, 23C e 24C).

Quando as médias destes percentuais foram analisadas, os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados para o percentual de contato osso-implante. Assim, foram identificadas diferenças estatísticas em razão da modificação da superfície do implante (nanotubos) e de sua associação a adesivo fibrínico e/ou ácido tranexâmico entre o Grupo I (Implante Usinado) e Grupo VIII (Implante Anodizado/ Adesivo Fibrínico (Tissucol)/Ácido Tranexâmico). As médias percentuais para cada grupo podem ser observadas na Tabela 2.

O teste estatístico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) foi realizado para testar a hipótese de que os diferentes grupos apresentam ou não resultados estatisticamente semelhantes em razão do tratamento de superfície do implante e dos diferentes materiais de preenchimento (Gráficos 1 e 2).

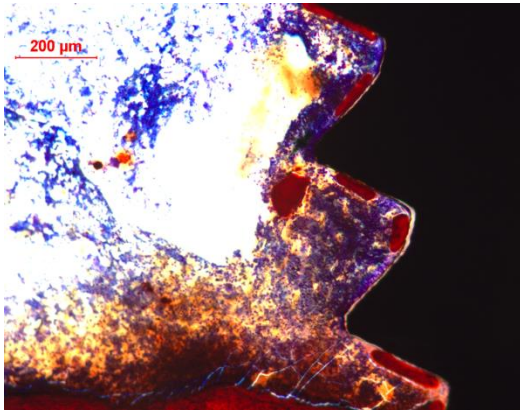


Figura 20A. Grupo I – Implante usinado/Controle – 60 dias. Coloração com vermelho de alizarina e azul de Stevenel. Junto ao implante é possível observar pequenas regiões de tecido ósseo.

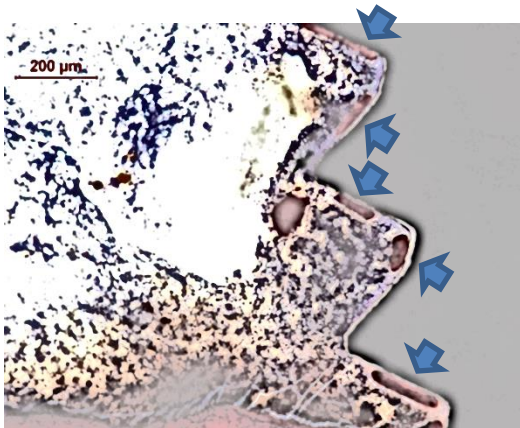


Figura 20B. Grupo I – Implante usinado/Controle – 60 dias. Mensuração linear no perímetro osso/implante para determinação do percentual de contato osso/implante.

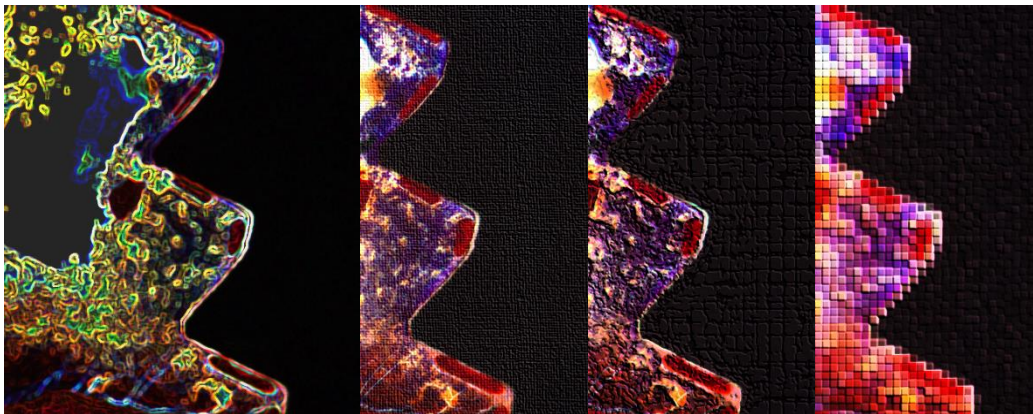


Figura 20C. Grupo I – Implante usinado/Controle – 60 dias. Mensuração do percentual de área óssea total dentro dos limites das roscas do implante.

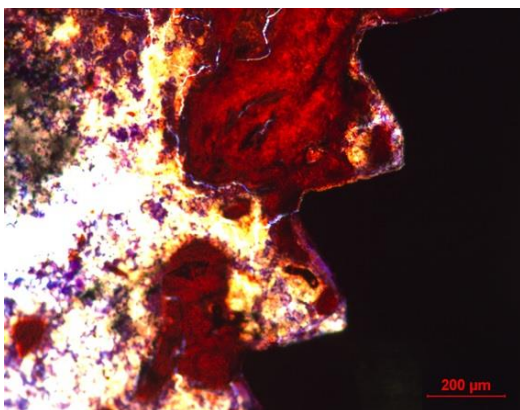


Figura 21A. Grupo II – Implante usinado/Adesivo Fibrínico – 60 dias. Coloração com vermelho de alizarina e azul de Stevenel. Junto ao perímetro do implante é possível observar extensas áreas de tecido ósseo.

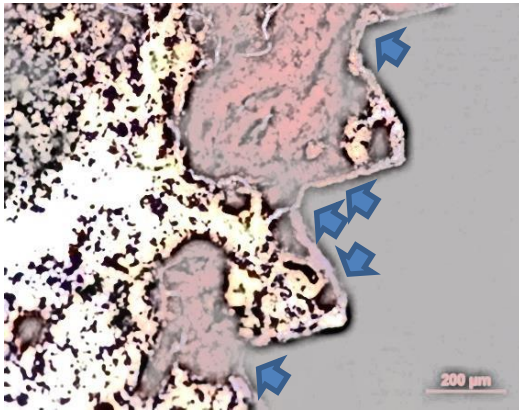


Figura 21B. Grupo II – Implante usinado/Adesivo Fibrínico – 60 dias. Mensuração linear no perímetro osso/implante para determinação do percentual de contato osso/implante.

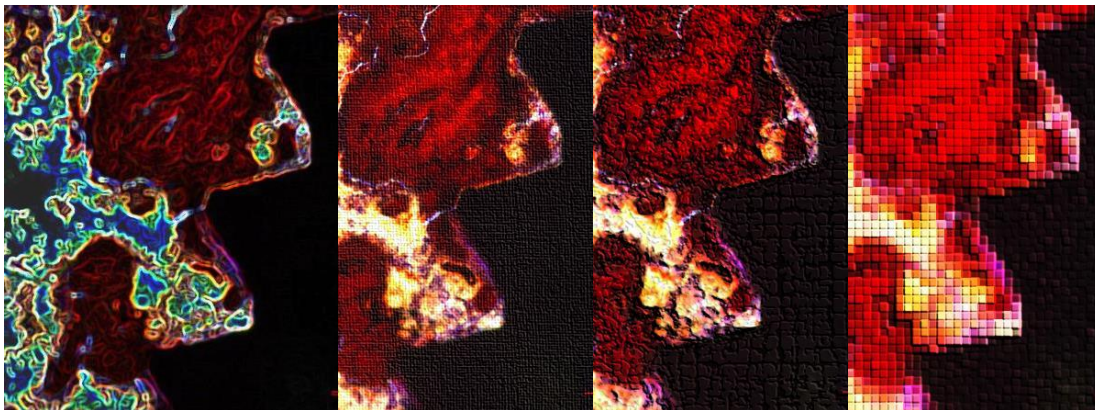


Figura 21C. Grupo II – Implante usinado/Adesivo Fibrínico – 60 dias. Mensuração do percentual de área óssea total dentro dos limites das roscas do implante.

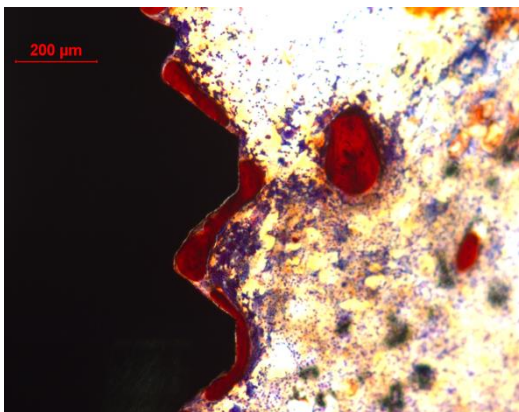


Figura 22A. Grupo III – Implante Usinado/Ácido Tranexâmico – 60 dias. Implante usinado – Coloração com vermelho de alizarina e azul de Stevenel. Junto ao implante é possível observar tecido ósseo em estreita faixa em contato com o implante.

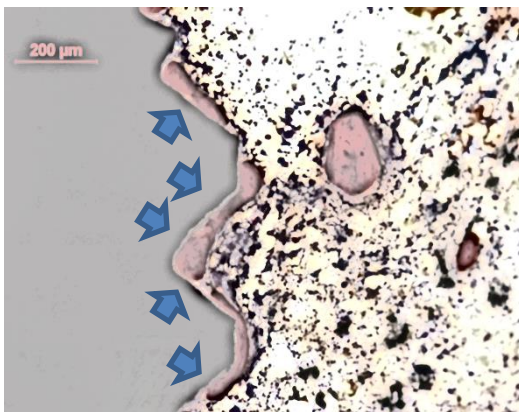


Figura 22B. Grupo III – Implante Usinado/Ácido Tranexâmico – 60 dias. Mensuração linear no perímetro osso/implante para determinação do percentual de contato osso/implante.

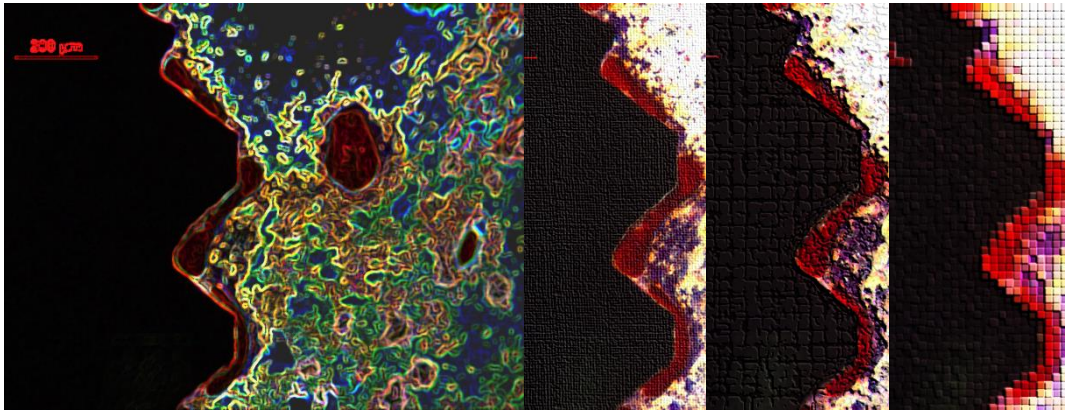


Figura 22C. Grupo III – Implante Usinado/Ácido Tranexâmico – 60 dias. Mensuração do percentual de área óssea total dentro dos limites das roscas do implante.

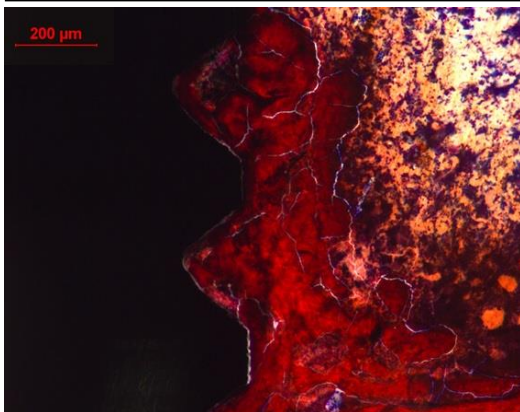


Figura 23A. Grupo IV – Implante usinado/Adesivo Fibrínico/Ácido Tranexâmico – 60 dias. Coloração com vermelho de alizarina e azul de Stevenel. Observa-se aumento na formação óssea quando comparada aos Grupos II (Implante usinado/Adesivo Fibrínico), III (Implante Usinado/Ácido Tranexâmico) e I (Implante usinado - Controle).

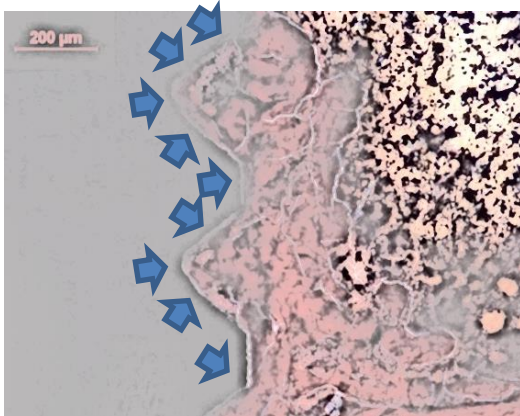


Figura 23B. Grupo IV – Implante usinado/Adesivo Fibrínico/Ácido Tranexâmico – 60 dias. Mensuração linear no perímetro osso/implante para determinação do percentual de contato osso/implante.

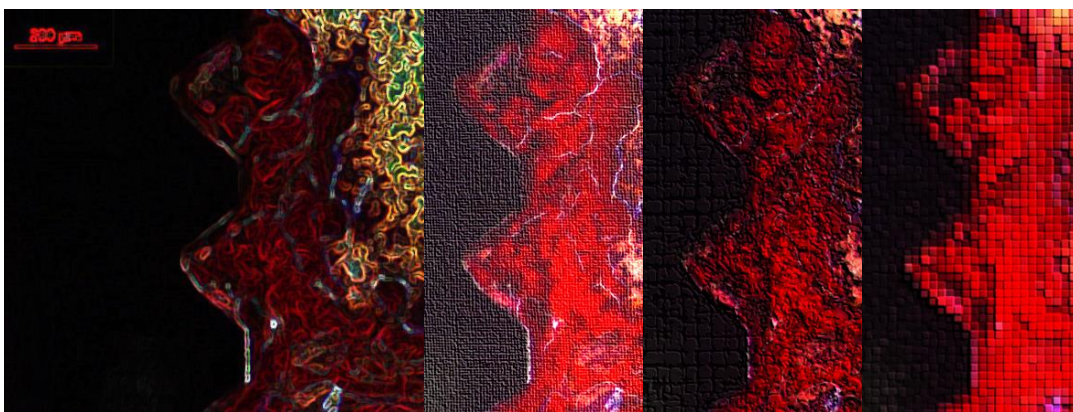


Figura 23C. Grupo IV – Implante usinado/Adesivo Fibrínico/Ácido Tranexâmico – 60 dias. Mensuração do percentual de área óssea total dentro dos limites das roscas do implante.

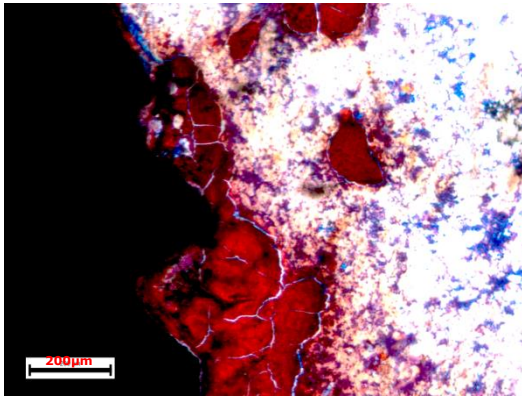


Figura 24A. Grupo V – Implante Anodizado – 60 dias. Coloração com vermelho de alizarina e azul de Stevenel. Observa-se aumento na formação óssea quando comparada ao Grupo I (Implante usinado - Controle).

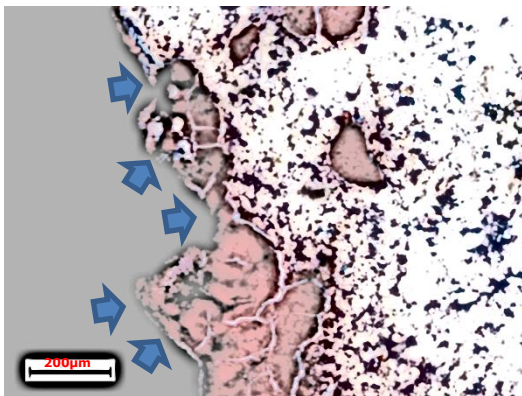


Figura 24B. Grupo V – Implante Anodizado – 60 dias. Mensuração linear no perímetro osso/implante para determinação do percentual de contato osso/implante

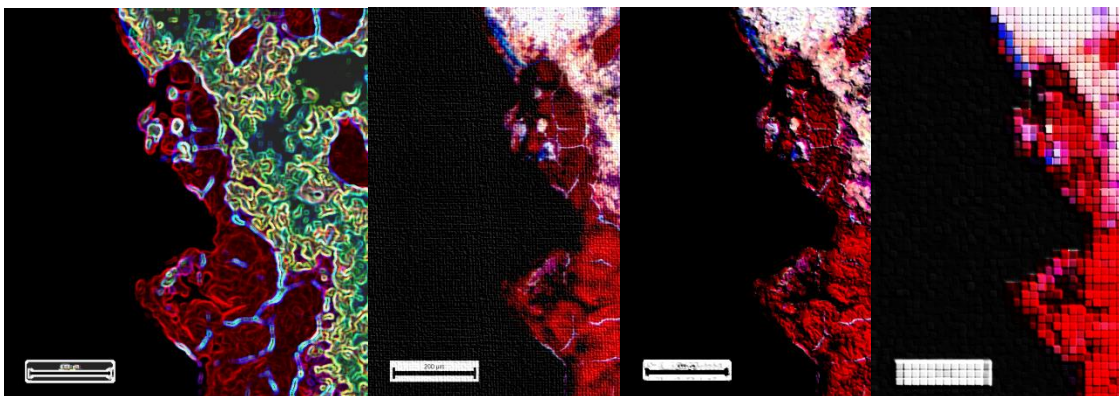


Figura 24C. Grupo V – Implante Anodizado – 60 dias. Mensuração do percentual de área óssea total dentro dos limites das roscas do implante.

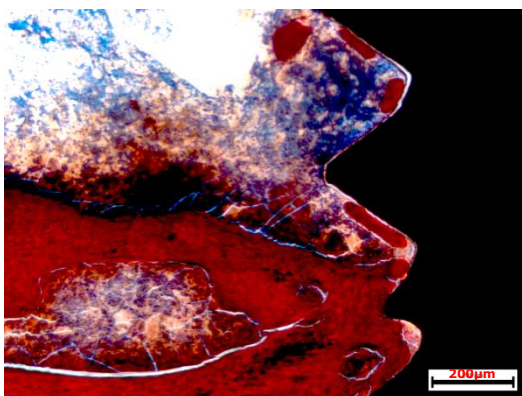


Figura 25A. Grupo VI – Implante Anodizado/Adesivo Fibrínico – 60 dias. Coloração com vermelho de alizarina e azul de Stevenel. Observa-se junto ao perímetro do implante extensas áreas de tecido ósseo.

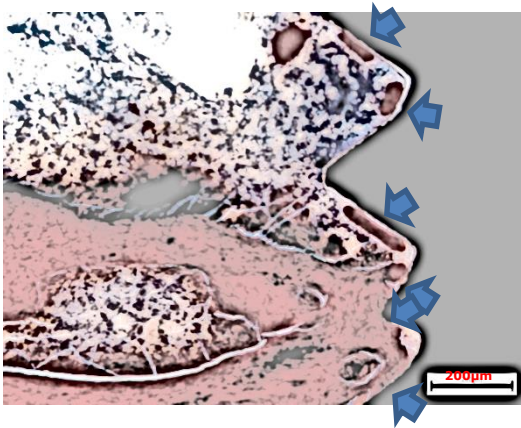


Figura 25B. Grupo VI – Implante Anodizado/Ácido Tranexâmico – 60 dias. Mensuração linear no perímetro osso/implante para determinação do percentual de contato osso/implante

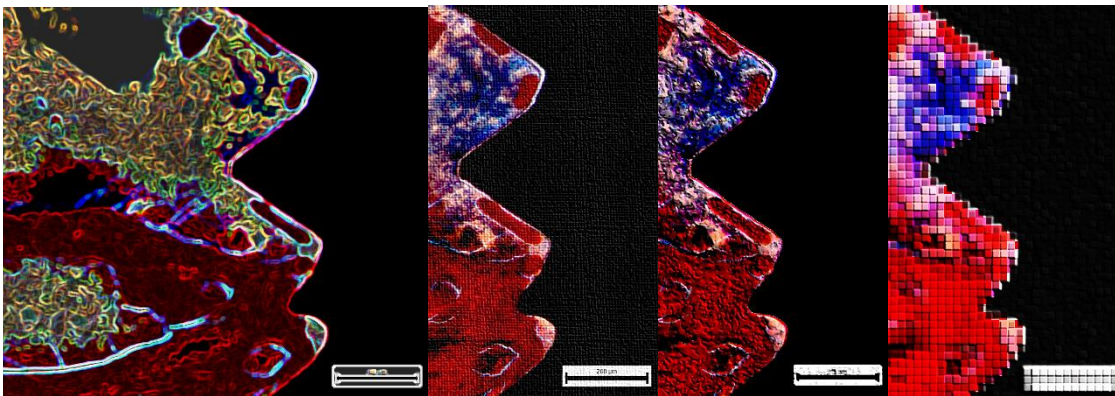


Figura 25C. Grupo VI – Implante Anodizado/Ácido Tranexâmico – 60 dias. Mensuração do percentual de área óssea total dentro dos limites das roscas do implante.

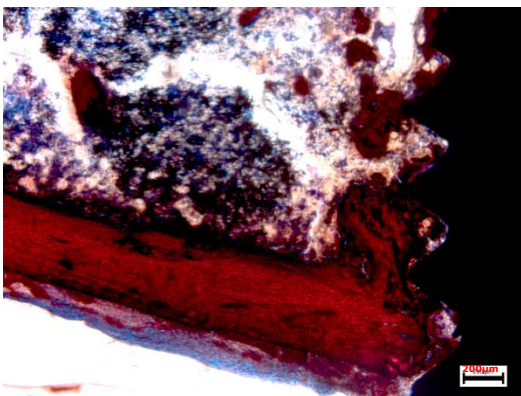


Figura 26A. Grupo VII – Implante Anodizado/Ácido Tranexâmico – 60 dias. Coloração com vermelho de alizarina e azul de Stevenel. Observa-se junto ao perímetro do implante massas ósseas irregulares.

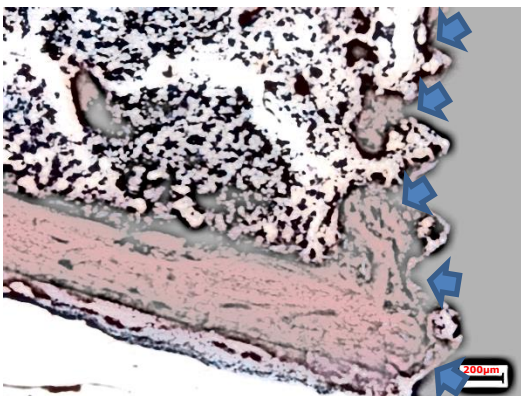


Figura 26B – Grupo VII – Implante Anodizado/Ácido Tranexâmico – 60 dias. Mensuração linear no perímetro osso/implante para determinação do percentual de contato osso/implante.

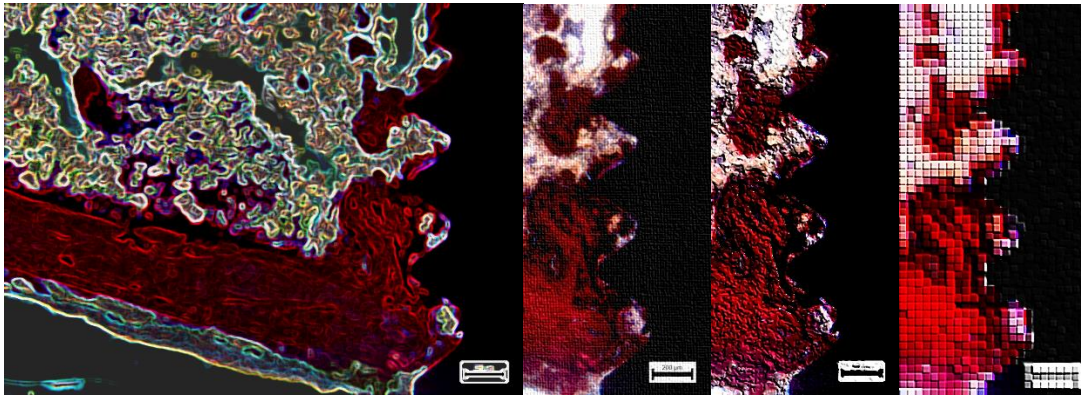


Figura 26C. Grupo VII – Implante Anodizado/ Ácido Tranexâmico – 60 dias. Mensuração do percentual de área óssea total dentro dos limites das roscas do implante.



Figura 27A. Grupo VIII – Implante Anodizado/ Adesivo Fibrínico/Ácido Tranexâmico – 60 dias. Coloração com vermelho de alizarina e azul de Stevenel. Observa-se aumento na formação óssea quando comparada aos Grupos V (Implante Anodizado), VI (Implante Anodizado/Adesivo Fibrínico) e VII (Implante Anodizado/Ácido Tranexâmico).

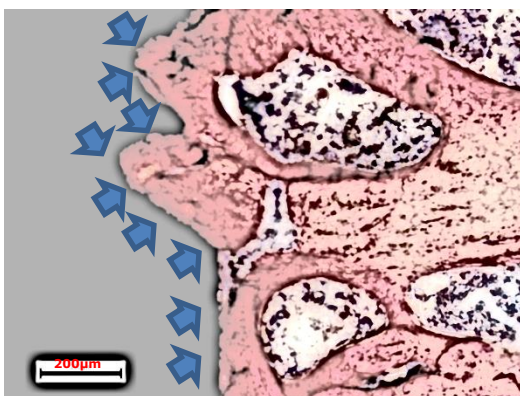


Figura 27B. Grupo VIII – Implante Anodizado/ Adesivo Fibrínico/Ácido Tranexâmico – 60 dias. Mensuração linear no perímetro osso/implante para determinação do percentual de contato osso/implante.

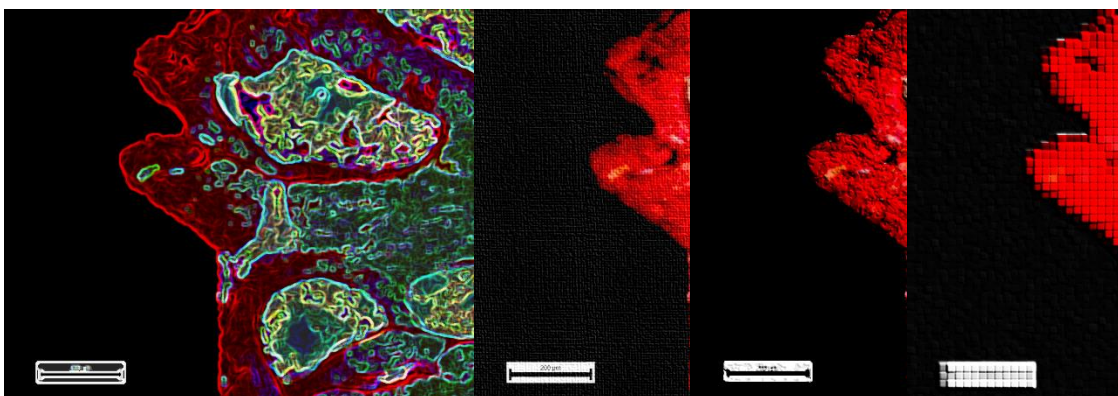


Figura 27C. Grupo VIII – Implante Anodizado/ Adesivo Fibrínico/Ácido Tranexâmico – 60 dias. Mensuração do percentual de área óssea total dentro dos limites das roscas do implante.

Tabela 3. Percentual de contato osso/implante

% de contato	Grupos							
	G I	G II	G III	G IV	G V	G VI	G VII	G VIII
	37.9a	58.2a	43.5a	89.7a	69.1a	74.8a	51.2a	98.7b

* Valores com o mesmo sobrescrito são estatisticamente similares (Kruskal-Wallis)

Gráfico 1. Diferenças entre os postos das médias ((Kruskal-Wallis)) para o percentual de contato osso/implante

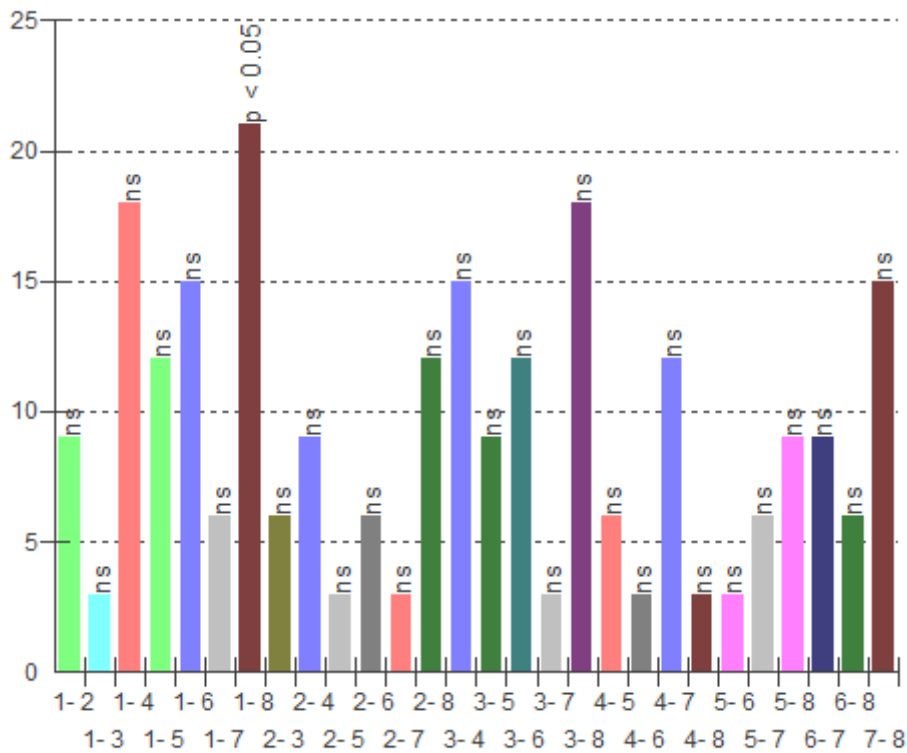
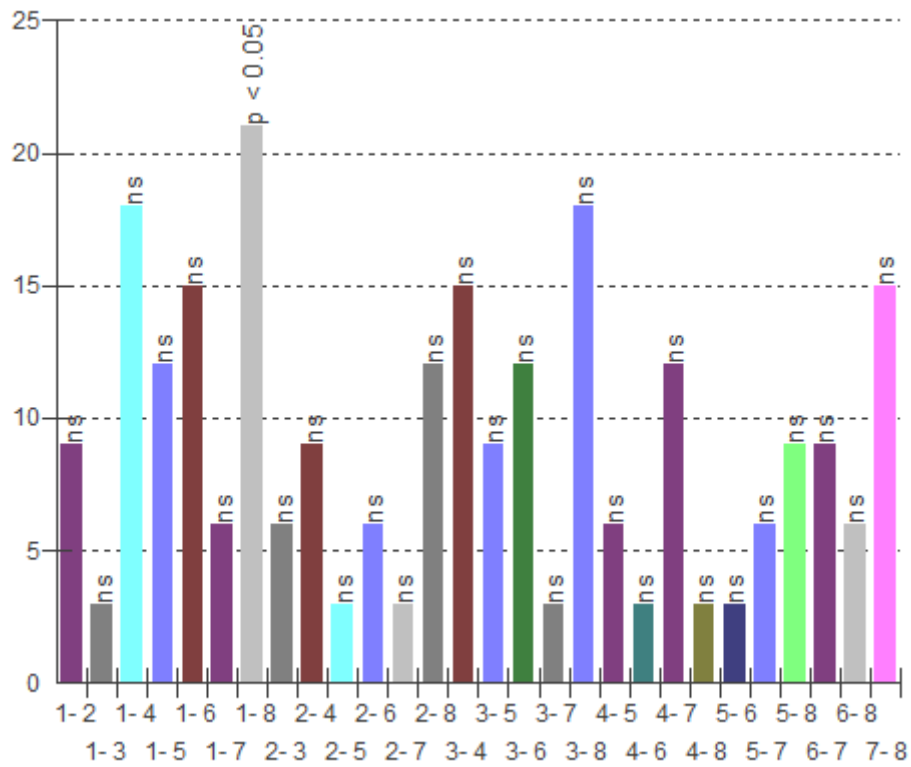


Tabela 4. Percentual de área óssea dentro dos limites das roscas do implante

% área óssea	GRUPOS							
	G I	G II	G III	G IV	G V	G VI	G VII	G VIII
	6.8a	62.1a	13.5a	79.7a	65.6a	73.4a	41.2a	96.3b

* Valores com o mesmo sobrescrito são estatisticamente similares (Kruskal-Wallis).

Gráfico 2. Diferenças entre os postos das médias ((Kruskal-Wallis)) para o percentual de área óssea dentro dos limites das roscas do implante



Discussão

Discussão

Após a instalação de um implante, a resolução do coágulo sanguíneo se mostra invariavelmente seguida pela invasão do sítio cirúrgico por uma rede tridimensional de fibrina e colágeno do tipo III, de células endósseas de fenótipo osteogênico e células mesenquimais, o que será concomitante com a nova vascularização²². As células irão interagir com o meio através de proteínas de adesão específicas. As células mesenquimais tendem a usar fibronectina para ancorá-las ao colágeno de sua matriz extracelular. A fibronectina é sintetizada pelas células de origem mesenquimal e está presente no soro do local do trauma cirúrgico. A energia de superfície do material, fortemente influenciada pelas alterações superficiais do implante, pode influenciar o tipo de proteína que será aderida. Vale lembrar que o potencial para a proteína sofrer um rearranjo estrutural também é uma variável importante²².

A arquitetura cortical vascular será destruída pelo trauma cirúrgico independentemente da geometria do implante. No córtex, ocorrerá a princípio a necrose do tecido ósseo. Somente através do remodelamento ósseo ocorrerá posteriormente uma substituição do osso pré-implante com a possibilidade de formação de novo tecido ósseo na superfície do implante. Existem duas possíveis hipóteses para explicar como as células ósseas migram para a superfície do implante: na primeira forma elas viriam diretamente da trabécula vizinha; no segundo modo as células migrariam através da matriz tridimensional. O primeiro método é o menos provável, já que a trabécula vai estar danificada pelo trauma cirúrgico e a superfície do implante estará coberta com proteínas por meio de um mecanismo de adsorção. No segundo método, mais provável, a migração se daria através da rede tridimensional. Para tanto, torna-se imprescindível que a superfície do implante ancore a rede tridimensional. A ancoragem é necessária para suportar as contrações de tecido que irão ocorrer por ocasião do remodelamento. Em implantes dentários a ancoragem é essencialmente mecânica. No entanto, acredita-se que também ocorra ancoragem química e potencialização da adsorção proteica em implantes recobertos com materiais bioativos²².

Vários estudos têm avaliado a macro e microgeometria dos materiais, bem como técnicas e instrumentação cirúrgica na tentativa de promover o preenchimento ósseo do defeito sob o ponto de

vista clínico, mecânico e biológico, garantindo, além de melhor contorno alveolar, previsibilidade no processo de osseointegração²⁵⁻²⁷.

Metais que se ionizam facilmente, como o titânio, são tolerados biologicamente porque sobre sua superfície ocorre a formação espontânea de filme estável de óxido. Os metais preciosos não são adequados para utilização como biomateriais porque geralmente são muito dúcteis e aqueles com maiores valores de dureza contêm metais tóxicos como cobre, cádmio e zinco^{22,23}. Materiais com estruturas moleculares semelhantes a proteínas ou polissacarídeos são facilmente reabsorvidos pelo organismo^{22,23}.

A avaliação do contato de células com filmes metálicos em microscópio eletrônico de transmissão revelou que o contato com filmes de titânio ocorre de forma direta, ao contrário do que foi observado com outros metais como o ouro, platina e paládio, onde pode ser observado espaço entre o citoplasma das células e o metal. Isto pode ser explicado pelo fato de que o óxido de titânio adsorve moléculas de água²⁸.

Alves-Rezende et al.³ lembram que a ancoragem primária diminuída e retardo e/ou deficiência do processo de osseointegração podem ocorrer quando implantes são instalados imediatamente após a extração dentária. Isto se dá em razão da ampla interface entre as paredes circundantes do alvéolo e a superfície do implante²⁵⁻²⁷.

O presente estudo foi proposto com a intenção de avaliar se o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio CP instalados sem estabilidade primária era dependente da anodização da superfície do implante (formação de nanotubos) e de sua associação a adesivo fibrínico e/ou ácido tranexâmico. Duas hipóteses foram testadas: 1) o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio CP instalados sem estabilidade primária independe da modificação da superfície do implante (nanotubos) e de sua associação a adesivo fibrínico e/ou ácido tranexâmico e 2) o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio CP instalados sem estabilidade primária é favorecido pela modificação da superfície do implante (nanotubos) e de sua associação a adesivo fibrínico e/ou ácido tranexâmico. De acordo com os resultados encontrados neste trabalho, a resposta do percentual de contato osso-implante obtido com a associação adesivo fibrínico/ácido tranexâmico foi de 89.7% e 98.7%,

respectivamente, para o implante usinado ou anodizado. O percentual de área óssea no interior das roscas também foi maior nestes dois grupos, com valores de 79.7% e 96.3%, respectivamente para os grupos IV (Implante usinado/ adesivo fibrínico/ácido tranexâmico) e VIII (Implante anodizado/ adesivo fibrínico/ácido tranexâmico). Parece importante destacar que esses resultados devem ser interpretados cuidadosamente, por essa porcentagem não representar a qualidade óssea do tecido que foi formado. Aceita-se portanto a segunda hipótese e rejeita-se a primeira. Kalebo et al.⁶³ avaliaram o efeito da associação de sistema adesivo fibrínico na taxa de reparação ao redor de implantes de titânio cp. Concluíram que a osseointegração foi fortemente influenciada pelo uso do material em associação ao implante.

Urban et al.⁶⁴ estudaram o efeito do adesivo fibrínico Beriplast® associado à partículas cerâmicas, hidroxiapatita ou fosfato tricálcico na velocidade da osseointegração de implantes. Observaram facilitação no processo de reparação além da incorporação dos materiais particulados ao organismo. As expectativas futuras são de que a associação tratamento superficial por meio de anodização / adesivo fibrínico/ácido tranexâmico irão resultar em novas estratégias capazes de contribuir favoravelmente para a osseointegração em pacientes com alterações metabólicas.

Conclusão

Conclusão

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos é possível concluir que:

- O reparo ósseo ao redor de implantes de titânio CP instalados sem estabilidade primária foi favorecido pela anodização da superfície do implante (formação de nanotubos) e de sua associação a adesivo fibrínico /ácido tranexâmico.

Referências

Referências

1. Abiraman S, Varma HK, Umashankar PR, John A. Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. *Biomaterials*. 2002 ;23:3023-31.2.
2. Allam, NK, X. J. FENG, Self-assembled fabrication of vertically oriented Ta₂O₅ nanotube arrays, and membranes thereof, by one-step tantalum anodization. *Chemistry of Materials* 2008; 20(20): 6477-81.
3. Alves-Rezende MCR, Carvalho LMF, Louzada MJQ, Escada ALA, Cpaelato P, Grandini CR, Alves-Claro APR. Análise morfológica de implantes do sistema Ti-Ta. Influência do ácido tranexâmico. *Unopar Científica - Ciências Biológicas e da Saúde - Anais do 48º Encontro do GBMD 2012*; 14:2
4. Alves-Rezende MC, Okamoto T: Effects of fibrin adhesive material (Tissucol) on alveolar healing in rats under stress. *Braz Dent J* 1997; 8(1):13-9.
5. Alving BM; Weinstein MJ; Finlayson JS; Menitone JE, Fratantoni JC: Fibrin sealant: summary of a conference on characteristics and clinical uses. *Transfusion*, 1995; 35:783-90.
6. Balla VK, Banerjee S. Direct laser processing of a tantalum coating on titanium for bone replacement structures. *Acta Biomaterialia* 2010; 6: 2329-34.
7. Baron R, Wildgoose GG, Compton RG. Metallic nanoparticles deposited on carbon microspheres: novel materials for combinatorial electrochemistry and electroanalysis. *J Nanosci Nanotechnol*. 2009; 9:2274-82.
8. Beltrão G, Andrade M. Aspectos biológicos da utilização do gel de plasma rico em plaquetas na reconstrução de maxilares com enxerto. *BCI* 2001; 8:324-28.
9. Brandão ML, Esposti TBD, Bisognin ED, Haran ND, Vidigal GM, Conz MB. Superfície dos implantes osseointegrados X resposta biológica. *REVISTA IMPLANTNEWS* 2010;7(1):95-101
10. Burstein FD, Cohen SR, Hudgins R, Boydston W, Simms C. The use of hydroxyapatite cement in secondary craniofacial reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 1999 ;104:1270-5.

11. Bye FL, Krause ME, Regezi JA, Caffesse RG. Histologic evaluation of periodontal implants in biologically “closed” model. J Periodontol, Chicago 1987; 58:110-14.
12. Camarini ET, Yamashita HY, Farah GJ, Iwaki-Fo L, Pavan AJ. Utilização de biomateriais associados ou não ao plasma rico em plaquetas em cavidades ósseas cranianas. Estudo microscópico em cães. Pesq Bras Odontoped Clin Integr 2006: 199-206.
13. Cancian DCJ. Utilização de Biogran® e Calcitite® em defeitos ósseos. Estudo histológico em macacos cebus apella. 1998. 93f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.
14. Carvalho PSP, Garcia-Júnior IR, Consolaro A, et al: Estudo experimental sobre matriz natural de osso esponjoso em cavidades ósseas. Innovations Magazine 2: 13, 1998.
15. Cox S, Cole M, Mankarious S, Tawil N. Effect of tranexamic acid incorporated in fibrin sealant clots on the cell behavior of neuronal and nonneuronal cells. J Neurosci Res. 2003;72(6):734-46.
16. Dahlback B — Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. J Intern Med, 2005,57:209-223.
17. Davies JE: Understanding peri-implant endosseous healing. J. Dent. Educ 2003; 67: 932.
18. De Oliveira JAG, Escada ALA; Alves-Rezende MCR; Mathor MB; Alves-Claro, APR. Analysis of the effects of irradiation in osseointegrated dental implants. Clinical Oral Implants Research 2012; 23 :511-14.
19. Dunn CJ, Goa KL. Tranexamic acid: a review of its use in surgery and other indications. Drugs. 1999 Jun;57(6):1005-32.
20. Feng B, Weng J, Yang BC, Qu SX, Zhang XD. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. Biomaterials 2003; 24: 4663:70.
21. Fernandes NI, Machado IG, Minello LF. Enxertos com osso autógeno e xenógeno: avaliação histológica. RGO, Porto Alegre, v. 46, n. 3, p.162-168, jul./set.1998.

22. Furst W, Banerjee A, Redl H. Comparison of structure, strength and cytocompatibility of a fibrin matrix supplemented either with tranexamic acid or aprotinin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007 ;82(1):109-14.
23. Hermeto LC, Rossi Rd, Pádua SB, Pontes ER, Santana AE. Comparative study between fibrin glue and platelet rich plasma in dogs skin grafts. *Acta Cir Bras.* 2012 Nov;27(11):789-94.
24. Homsen H. Ethanol-insoluble adenine nucleotides in platelets and their possible role in platelet function. *Ann N Y Acad Sci.* 1972; 27:109-21.
25. Hoylaerts M, Lijnen HR, Colleen D — Studies on the mechanism of the antifibrinolytic action of tranexamic acid. *Biochim Biophys Acta,* 1981;18:75-85.
26. Isogai N, Landis WJ, Mori R, Gotoh Y, Gerstenfeld LC, Upton J, Vacanti JP. Experimental use of fibrin glue to induce site-directed osteogenesis from cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105(3):953-63. Ivanoff CJ, Sennerby L, Lekholm U: Influence of mono and bicortical anchorage on the integration of titanium implants. A study in the rabbit tibia. *Int. J. Oral Maxillofac Surg* 1996; 25 (3): 229-35.
27. Jha N, Ramaprabhu S. Carbon nanotube-polymer based nanocomposite as electrode material for the detection of paraoxon. *J Nanosci Nanotechnol.* 2010 ;10:2798-802.
28. Johansson CB, Albrektsson TA: A removal torque and histomorphometric study of commercially pure niobium and titanium implants in rabbit bone. *Clin Oral Impl Res* 1994; 2:24.
29. Keating JF, McQueen MM. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J Bone Jt Surg Br,* 2001; 83: 3-8.
30. Kim EJ, Kim WG, Jeong YH, Choe HC. Nanotubular oxide surface and layer formed on the Ti-35Ta-xZr alloys for biomaterials. *J Nanosci Nanotechnol.* 2011 Aug;11(8):7433-7.
31. Le Guéhennec L, Layrolle P, Daculsi G. A review of bioceramics and fibrin sealant. *Eur Cell Mater.* 2004; 13:1-10.

32. Levi M, Cromheecke EM, Jonge et al. — Pharmacological strategies to decrease excessive blood loss in cardiac surgery: a meta-analysis of clinically relevant endpoints. *Lancet*, 1999;354:1940-1948
33. Lioubavina-Hack N, Lang NP, Karring T: Significance of primary stability for osseointegration of dental implants. *Cin. Oral Impl Res* 2006; 17: 24
34. Lorenzoni M, Pertl C, Keil C, Wegscheider WA. Treatment of peri-implant defects with guided bone regeneration: a comparative clinical study with various membranes and bone grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; 13 (5): 639-46.
35. Luz L, Sankarankutty A, Passos E, Rizoli S, Fraga GP, Nascimento Jr B, Ácido tranexâmico no tratamento da hemorragia no trauma. *Rev Col Bras Cir.* [periódico na Internet] 2012; 39(1). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc> Martinowitz U; Saltz R: Fibrin sealant. *Curr Opin Hematol* 1996; 3:396-402.
36. Matras H - Fibrin sealant in maxillofacial surgery. Development and indications. A review of the past 12 years. *Facial Plast Surg.* 1985;2(4):297-313.
37. Mazzo CR, Reis AC, Shimano AC, Valente ML Costa. In vitro analysis of the influence of surface treatment of dental implants on primary stability. *Braz. Oral Res.* 2012; 26:313-7.
38. Ministério da Saúde/Secretaria de Atenção à saúde/Departamento de Atenção Especializada/Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados. Nota técnica sobre o uso do ácido tranexâmico – Disponível em [HTTP://portal.saude.gov.br/portal/arquivos](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos)
39. Oh S, Daraio C, Chen LH, Pisanic TR, Fiñones RR, Jin S. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes. *J Biomed Mater Res A.* 2006 ;78(1):97-103
40. Okamoto T, Alves-Rezende MCR, Okamoto AC, Buscariolo IA, Garcia IR Jr: Osseous regeneration in the presence of fibrin adhesive material(Tissucol) and epsilon-aminocaproic acid (EACA). *Braz Dent J* 6(2):77-83, 1995

41. Okamoto T, Okamoto R, Alves-Rezende MC, Gabrielli MF: Interference of the blood clot on granulation tissue formation after tooth extraction. Histomorphological study in rats. *Braz Dent J* 1994; 5(2):85-92.
42. Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K, Burmester GR, Sittinger M. Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. *Biomaterials* 2000; 21: 1145-53.
43. Roberts I, Shakur H, Ker K, Coats T, CRASH-2 trial collaborators. Antifibrinolytic therapy for acute traumatic injury. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;1:CD004896.
44. Ruck M , Kaiser M, Kohler D, Krumeich F, Boldt R. High-yield synthesis and structure of double-walled bismuth-nanotubes. *Nano Lett* 2010; 10:208-10.
45. Schmitz JP, Hollinger JO. The biology of platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2001; 59: 1119-21.
46. Sennerby L, Thomsen P, Ericsson LE. A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992;7:62-71.
47. Sheng J, Hu L, Xu S, Mo L, Tian H, Dai S. A study on formation of titanium oxide nanoribbons. *J Nanosci Nanotechnol.* 2011;11:9924-7.
48. Shimojo N, Kondo C. Cytotoxicity analysis of a novel titanium alloy in vitro: Adhesion, spreading, and proliferation of human gingival fibroblasts. *Bio-Medical Materials and Engineering* 17(4): 255-255. 2007
49. Simson J, Crist J, Strehin I, Lu Q, Elisseeff JH. An orthopedic tissue adhesive for targeted delivery of intraoperative biologics. *J Orthop Res* 2013; 31(3): 392-400.
50. Smith BS, Yoriya S. Hemocompatibility of titania nanotube arrays. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2010; 95: 350-60. 2010.
51. Souza FA. Aplicação do copolímero pla/pgs adicionado ao fosfato de cálcio ao redor de implantes osseointegráveis instalados sem estabilidade primária em tíbia de coelhos. Estudo

- biomecânico, histométrico e imunoistoquímico. 2006. 66f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP.
52. Takei T, Yonesaki Y, Kumada N, Kinomura N. Preparation of oriented titanium phosphate and tin phosphate/polyaniline hybrid films by electrochemical deposition. *Langmuir*. 2008;24:8554-60.
53. ten Hallers EJ, Jansen JA, Marres HA, Rakhorst G, Verkerke GJ. Histological assessment of titanium and polypropylene fiber mesh implantation with and without fibrin tissue glue. *J Biomed Mater Res A*. 2007 ;80(2):372-80.
54. Turunen T, Peltola J, Helenius H, Yli-Urpo A, Happonen RP. Bioactive glass and calcium carbonate granules as filler material around titanium and bioactive glass implants in the medullar space of the rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res* 1997 ;8:96-102.
55. Wang C, Karlis GA, Anderson GI, Dunstan CR, Carbone A, Berger G, Ploska U, Zreiqat H. Bone growth is enhanced by novel bioceramic coatings on Ti alloy implants. *J Biomed Mater Res A*. 2009 ;90:419-28.
56. Wang K. The use of titanium for medical applications in the USA. *Materials Science and Engineering: A* 213(1-2): 134-137. 1996.
57. Wang N, LI H, Lu W, Li J, Wang J, Zhang Z, Liu Y. Effects of TiO₂ nanotubes with different diameters on gene expression and osseointegration of implants in minipigs. *Biomaterials* 2011; 32: 6900-11.
58. Wei W, Shaw S, Lee K, Schmuki P. Rapid Anodic Formation of High Aspect Ratio WO₃ Layers with Self-Ordered Nanochannel Geometry and Use in Photocatalysis. *Chemistry*. 2012; 18:14622-6.
59. Wheeler DL, Stokes KE, Park HM, Hollinger JO. Evaluation of particulate Bioglass® in a rabbit radius osteotomy model. *J Biomed Mater Res* 1997; 35: 249-54.
60. Wheeler DL, Stokes K.E, Hoellrich RG, Chamberland DL, McLoughlin SW. Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. *J Biomed Mater Res* 1998; 41: 527-33.

61. Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, Ueda M. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg.* 2003;31:27-33.
62. You TM, Choi BH, Zhu SJ, Jung JH, Lee SH, Huh JY, Lee HJ, Li J. Platelet-enriched fibrin glue and platelet-rich plasma in the repair of bone defects adjacent to titanium dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007;22(3):417-22.
63. Kalebo P, Buch P, Albrektsson T. Bone formation rate in osseointegrated titanium implants. Influence of locally applied haemostasis, peripheral blood, autologous bone marrow and fibrin adhesive system (FAS). *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1988; 22 (1):53-60.
64. Urban K, Povysil C, Spelda S. Effect of fibrin on osseointegration of bioactive glassceramic materials-experimental study. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2001; 68(3):168-75