



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



RAFAEL SILVEIRA FAEDA

***OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DE TITÂNIO
COM MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE POR
ABLAÇÃO A LASER E RECOBRIMENTO POR
HIDROXIAPATITA BIOMIMÉTICA. ESTUDO
BIOMECÂNICO E HISTOMORFOMÉTRICO EM TÍBIA
DE COELHOS.***

ARARAQUARA
2010



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



RAFAEL SILVEIRA FAEDA

OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DE TITÂNIO COM
MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE POR ABLAÇÃO A LASER E
RECOBRIMENTO POR HIDROXIAPATITA BIOMIMÉTICA.
ESTUDO BIOMECÂNICO E HISTOMORFOMÉTRICO EM
TÍBIA DE COELHOS.

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO – ÁREA DE PERIODONTIA, DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA, DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, PARA A OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE DOUTOR EM ODONTOLOGIA.

Orientador: *Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior*

ARARAQUARA
2010

Faeda, Rafael Silveira

Osseointegração de implantes de titânio com modificação da superfície por ablação a laser e recobrimento por hidroxiapatita biomimétrica. Estudo biomecânico e histomorfométrico em tíbia de coelhos. / Rafael Silveira Faeda.– Araraquara: [s.n.], 2010.

165 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador : Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior

1. Implante dentário endoósseo 2. Osseointegração 3. Torque
4. Lasers 5. Materiais biocompatíveis I. Título

BANCA EXAMINADORA

- Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior (Orientador)
- Prof. Dr. Celso Eduardo Sakakura - Faculdade de Odontologia de Barretos
- Prof^a. Dra. Ana Emília Farias Pontes - Faculdade de Odontologia de Barretos
- Prof^a. Dra. Andréa Cândido dos Reis - FORP-USP - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
- Prof^a. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende - FOB-USP – Faculdade de Odontologia de Bauru

SUPLENTE

- Prof. Dr. José Eduardo César Sampaio – Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
- Prof. Dr. Wilson Trevisan Junior - UEL - Universidade Estadual de Londrina
- Prof. Dr. Rogério Margonar - UNIARA- Universidade de Araraquara

DADOS CURRICULARES

Rafael Silveira Faeda

NASCIMENTO 25 de Agosto de 1982 – Ribeirão Preto / SP

FILIAÇÃO Zélio Faeda

Luiza Maria de Andrade Silveira Faeda

Graduação em Odontologia

2000-2003 Faculdade de Odontologia de Araraquara

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Pós-graduação em Periodontia – Nível de Mestrado

2004-2006 Faculdade de Odontologia de Araraquara

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Pós-graduação em Periodontia – Nível de Doutorado

2006-2010 Faculdade de Odontologia de Araraquara

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Poema da Paz

O dia mais belo? Hoje
A coisa mais fácil? Equivocar-se
O obstáculo maior? O medo
O erro maior? Abandonar-se
A raiz de todos os males? O egoísmo
A distração mais bela? O trabalho
A pior derrota? O desalento
Os melhores professores? As crianças
A primeira necessidade? Comunicar-se
O que mais faz feliz? Ser útil aos demais
O mistério maior? A morte
O pior defeito? O mau humor
A coisa mais perigosa? A mentira
O sentimento pior? O rancor
O presente mais belo? O perdão,
O mais imprescindível? O lar
A estrada mais rápida? O caminho correto
A sensação mais grata? A paz interior
O resguardo mais eficaz? O sorriso
O melhor remédio? O otimismo
A maior satisfação? O dever cumprido
A força mais potente do mundo? A fé
As pessoas mais necessárias? Os pais
A coisa mais bela de todas? O amor.

MADRE TERESA DE CALCUTÁ

À **Deus**, que pelo dom da vida me deu a oportunidade de alcançar mais um objetivo, me dando coragem nos momentos difíceis, acompanhando e guiando meus passos.

Dedico este trabalho...

...Aos meus pais **Zélio** e **Luiza** pela constante demonstração de carinho, amor, compreensão e apoio durante toda a minha vida, e por todo esforço e sacrifício para minha formação. Minha eterna gratidão. Tenho muito orgulho de vocês!

... Às minhas irmãs **Marília**, **Elisa** e **Laís**, que apoiaram a minha opção, participando em todos os momentos, longe ou perto.

... À minha querida esposa Carolina (**Carol**), pelos momentos em que não pude estar presente da forma que eu queria e que você merecia, por seu incentivo, amor e companheirismo, que impulsionam e completam a minha vida.

Agradecimentos Especiais

Ao **Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior**, pela confiança oportunidades de aprendizado que tive desde o início. Agradeço a amizade e o carinho que teve por mim, estando sempre disposto a me ajudar de maneira compreensiva e paciente, fazendo muito mais do que sua obrigação. Espero não ter decepcionado suas expectativas e ser merecedor da sua confiança.

À **Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio**, pela amizade, apoio, carinho e atenção, que se estenderam além do ambiente universitário.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Guastaldi**, que sempre se esforçou para passar um pouco do seu conhecimento em química, permitindo que as inúmeras conversas que tivemos contribuíssem para meu crescimento científico.

Ao **Prof. Dr. Carlos Rossa Junior**, responsável pelo meu interesse em Periodontia e pela oportunidade de realizar o meu primeiro trabalho de pesquisa nesta disciplina, abrindo as portas para que eu chegasse até aqui. Muito obrigado por tudo que fez por mim.

*Ao **Prof. Dr. José Eduardo Cesar Sampaio, que foi muito mais que um professor, foi e continuará sendo um grande amigo.***

Aos amigos **Rafael, Maurício, Miltinho e Rubens**, pela amizade e companheirismo, pelos incontáveis bons momentos de convivência diária, pela ajuda e colaboração nas horas difíceis e por se tornarem meus novos irmãos.

Aos amigos **Humberto, Lucas, Guilherme, João e Rubens**, pelos inesquecíveis momentos de descontração que tivemos durante estes anos.

Aos **meus familiares**, que são parte da minha história, torcendo sempre pelas minhas conquistas.

À **família da Carol**, pela compreensão e incentivo constante.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segala, e Vice-Diretora,. Prof^a. Dr^a. Andreia Affonso Barreto Montandon.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação - Área de Periodontia, Prof Dr. Joni Augusto Cirelli, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação, pela formação e exemplo.

Aos amigos e Docentes da Disciplina de Periodontia, Prof. Dr. Benedicto Egbert Corrêa de Toledo, Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Prof^a Dr^a Rosemary Adriana Chiéricsi Marcantonio, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, Prof^a Dr^a Silvana Regina Perez Orrico, pela formação e orientação.

Aos amigos Rafael Sartori, Hewerson Tavares dos Santos e Juliana Moraes e Maurício Ribeiro Costa, pela ajuda na parte prática desse trabalho: esse trabalho também é de vocês!

Ao funcionário Celso Luis Borsato, por toda colaboração e eficiência durante a parte experimental deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biomateriais do Instituto de Química de Araraquara, pela atenção e profissionalismo.

A todos os funcionários da disciplina de Periodontia, Claudia, D. Maria do Rosário, Ester, Maria José, Thelma, Sueli e Toninho, cujo trabalho, dedicação e compreensão possibilitou a realização desse trabalho.

À Regina Lúcia, em especial, atenção, paciência e cooperação durante a realização do trabalho. Obrigado pelo carinho e pelo ombro amigo em todos os momentos.

À Claudia, pelo apoio e companheirismo ao enfrentar os desafios do laboratório Exakt.

Aos demais funcionários e colegas do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Aos amigos do curso de Pós-graduação em Periodontia, Dani Zandin, Gabi, Rafaela, Fábio, Roberto, Maurício, Rafa Sartori. pela amizade sincera e inesquecíveis momentos de convivência.

Aos amigos Celso e Rogério pela colaboração e ajuda no aprendizado do protocolo cirúrgico.

Aos professores e funcionários dos cursos de Especialização em Implante da APCD e FAEPO, pela amizade, confiança e oportunidade de crescimento constante.

À APCD Ribeirão Preto e aos professores e alunos pela parceria dos últimos anos no Curso de Aperfeiçoamento em Implante.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela paciência e admirável interesse em nos ajudar.

As meninas da biblioteca, Maria Helena, Marlei, Ceres, Adriano, Eliane, Inês.

Ao Dr. Sidival Dias, da Titanium Fix[®], pela simplicidade e atenção que nos atendeu.

À CAPES, pelo apoio financeiro concedido, indispensável para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	16
RESUMO	18
ABSTRACT	21
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 ARTIGO DE REVISÃO	28
3 PROPOSIÇÃO.....	69
4 MATERIAL E MÉTODO.....	71
4.1 Implantes	72
4.2 Desenvolvimento das Superfícies Testes.....	73
4.2.1 Modificação da Superfície por Feixe de Laser	73
4.2.2 Recobrimento da Superfície pela Hidroxiapatita Biomimética.....	75
4.3 Animais e Cuidados.....	78
4.4 Procedimentos Cirúrgicos	78
4.4.1 Cirurgia de Instalação dos Implantes	78
4.5 Teste Biomecânico	81

4.6 Preparação das amostras e análise histomorfométrica	83
4.7 <i>Análise Estatística</i>	86
5 RESULTADO.....	87
<i>Artigo 1</i>	89
<i>Artigo 2</i>	96
<i>Artigo 3</i>	106
6 DISCUSSÃO	142
7 CONCLUSÃO	152
8 REFERÊNCIAS	154
ANEXO	164

Lista de Abreviaturas

Abreviaturas usadas no texto:

Ticp: Titânio comercialmente puro

TPS: Plasma *spray* de titânio

HA: Hidroxiapatita

SAC.: Superfície tratada com ácidos

BIC: Contato osso implante

BBT: Área óssea entre espiras

TI O₂: Dióxido de titânio

SLA[®]: Jateada com partículas grandes e condicionada por ácido

MS: Superfície Usinada (machined surface)

LMS: Superfície modificada por laser (laser modified surface)

Ca: Cálcio

P: Fósforo

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

EDS: Energia Dispersiva de Raios-X

Faeda RS. Osseointegração de implantes de titânio com modificação da superfície por ablação a laser e recobrimento por hidroxiapatita biomimética. Estudo biomecânico e histomorfométrico em tíbia de coelhos [tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

Resumo

O sucesso dos sistemas modernos de implantes dentais tem sido relacionado ao desenvolvimento do design e das características de superfícies dos implantes. O propósito do presente estudo foi avaliar duas novas superfícies de implantes (modificada por laser - LMS e recoberta por hidroxiapatita biomimética - HA), comparando-as a outro implante comercial, (superfície usinada – MS). Um total de 144 implantes (3,75 x 10mm), 48 de cada superfície, foram instalados na tíbia de coelhos e avaliados após 4, 8 e 12 semanas. Após os períodos de cicatrização os animais foram sacrificados, um dos implantes expostos e a força necessária para derosquea-los foi aferida por um torquímetro analógico. O outro implante foi removido com o tecido ósseo peri-implantar e processado por corte histológico calcificado para análise histomorfométrica do contato osso-implante (BIC%) e da área óssea entre espiras (BBT%). Em 4 e 8 semanas, os implantes HA apresentaram valor de torque de remoção estatisticamente superior ($p<0,05$) quando

comparado aos demais, sendo o mesmo observado para os implantes LMS quando comparados aos MS. Após 12 semanas, os implantes HA e LMS foram estatisticamente superiores aos implantes MS. Por outro lado, a análise do contato osso-implante mostrou que na região cortical, os implantes LMS e HA foram estatisticamente superiores ao MS para todos os períodos de cicatrização, sem diferença estatística entre LMS e HA. A análise histomorfométrica mostrou que, quando comparados na região endosteal, os implantes LMS e HA foram estatisticamente superiores ao MS no período inicial de cicatrização. Embora os implantes LMS e HA não apresentassem diferenças estatísticas entre eles, uma tendência de maiores valores de BIC% para HA na região endosteal foi observada em todos os períodos do estudo. Os resultados deste estudo mostram que apesar de não haver diferença estatística quanto ao BIC% dos implantes LMS e HA, os resultados histométricos da região endosteal sugerem a existência de diferenças nas características do tecido ósseo em contato com os implantes HA e no mecanismo de adesão osso-implante, resultando em uma maior retenção dos implantes HA.

Palavras –chave: Implante dentário endoósseo, osseointegração, torque, lasers, materiais biocompatíveis.

Faeda RS. Osseointegration of titanium implants with surface modification by laser ablation and biomimetic hydroxyapatite coating. Biomechanical and Histomorphometrical study in rabbits tibia [tese Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

Abstract

Purpose: Considering the great biological potential of the association between laser ablation and hydroxyapatite thin layer coatings to create an interesting bioactive environment on titanium dental implants, the aim of the present study was to investigate, by histomorphometrical and removal torque analysis, the histological effects of a surface treatment created by laser-ablation (Nd:YAG) and, later, thin deposition of HA particles by a chemical process compared to implants with only laser-ablation and implants with machined surfaces.

Materials and Methods: Forty-eight rabbits received two implant by tibiae of the following surfaces: Machined surface (MS), laser-modified surface (LMS) and biomimetic hydroxiapatite coated surface (HA). After 4, 8 and 12 weeks of healing, one implant was exposed, and the needed force to unscrew measured using an analogical torque gauge. The other implant and surrounding bone was removed and prepared by a calcified histological process. The percentage of bone-to-implant contact (BIC) and the bone area formed between the threads (BBT) were evaluated separately to the cortical and endosteal region.

Results: The difference was statistically significant ($P < .05$) between the LMS-MS and HA-MS surfaces in all periods of evaluation, and between LMS-HA to 4 and 8 weeks of healing. The surface characterization showed a deep, rough, and

regular topography provided by the laser conditioning, that was followed by the HA coating. Average BIC percentage in the cortical region was significantly higher ($P<0.001$) on the LMS and HA implants, compared with MS ones for all periods of healing, having no statistical differences between LMS and HA. When compared in the endosteal area, the LMS and HA implants showed statistically higher ($P<0.01$) BIC percentage values than MS at the initial periods of healing (LMS after 4 weeks and HA after 4 and 8 weeks, respectively). The LMS and HA implants showed similar mean values in all evaluated periods in the cortical region, but a tendency of higher mean values for HA in the endosteal region was observed in all periods of the study. For the BBT% in the cortical region, HA implants were significantly superior to SU ($P<0.05$) after 4 weeks of implantation, and in the endosteal area, the HA was superior to the SU implants ($P<0.05$) only after 12 weeks of healing, having no differences for the other comparisons and periods. The surface characterization showed a deep, rough and regular topography provided by the laser conditioning, that was followed by the HA coating.

Conclusions: Based on these results, it was possible to conclude that the HA biomimetic coating with previous laser surface modification have the potential to induce the contact of osteogenesis and allows for the formation of a more stable bone-implant interface, even in earlier periods, increasing the bone retention.

Keywords: Dental implantation, endosseous, osseointegration, torque, lasers, biocompatible materials.

1 INTRODUÇÃO

O tratamento com implantes apresenta um alto índice de sucesso (>90%) quando bem indicado, o que tem estimulado seu uso em condições cada vez mais desafiadoras⁴. Os protocolos de carga imediata e precoce, colocação de implantes curtos em regiões de rebordo atrófico e instalação de implantes em pacientes com déficit na cicatrização por diferentes fatores (diabetes, deficiências metabólicas, osteoporose, radioterapia etc.), fazem cada vez mais, parte da rotina de atendimento da implantodontia, no entanto, são condições que exigem ao máximo um bom desempenho dos mecanismos envolvidos no processo de osseointegração²¹.

Considerando que a superfície é a primeira parte do implante a interagir com o organismo, os métodos para aumentar a biocompatibilidade e osteocondutividade dos implantes têm sido extensivamente estudados¹. As características das superfícies têm papel fundamental nos estágios iniciais da osseointegração. Sabe-se que a modificação da macro, micro e nanotopografia, altera as respostas biomoleculares e celular in vitro, bem como as respostas dos tecidos moles e ósseo in vivo^{8,22}. Diversos estudos demonstram um aumento da afinidade de osteoblastos e formação óssea mais rápida em contato com superfícies rugosas, em comparação a superfícies consideradas lisas^{19,54}.

Dessa forma, diferentes métodos para modificação química e da textura da superfície dos implantes foram desenvolvidos (plasma spray de titânio^{17,29}

e de hidroxiapatita^{24,50}, condicionamento ácido^{24,51}, condicionamento ácido associado a jateamento por AlO₂ ou TiO₂⁹⁻¹⁰, e ablação por laser^{12,18}) e têm apresentado resultados positivos quanto ao contato-osso implante e as propriedades mecânicas do tecido ósseo peri-implantar²⁻³.

Quanto aos métodos de modificação química da superfície, estudos da área básica e clínicos demonstram que os implantes recobertos por CaP possuem uma alta afinidade com o tecido ósseo, apresentando um mecanismo de oseointegração descrito como 'bone-bonding' (adesão química)^{2,10,18,38}. Essa camada cerâmica, quando em contato com o tecido vivo, sofre dissolução superficial induzida por atividade celular, liberando no meio extracelular íons Ca e P. Em acréscimo aos íons Ca e P, outros íons como Mg, Na e Co₃, presentes no fluido corpóreo, se incorporam aos microcristais de HA, formando uma forte interação com os cristais da superfície do biomaterial. Essa ação origina uma supersaturação do meio ao redor do implante levando à precipitação, ou seja, a mineralização da matriz extracelular promovendo a formação óssea⁴⁸.

Do ponto de vista comercial, o método mais utilizado para recobrimento da superfície de titânio por CaP tem sido o plasma-spray de hidroxiapatita (HA). Este método de recobrimento tem sido utilizado desde meados dos anos 80, apresentando excelente índice de oseointegração, no entanto, diversos estudos têm apontado falhas na integridade do recobrimento, tais como trincas, falhas de adesão ao implante, porosidade excessiva e solubilização⁴⁶⁻⁴⁷. Com a intenção de aproveitar os benefícios biológicos dos revestimentos a base de CaP,

diferentes metodologias para recobrimento têm sido desenvolvidas (pulverização, sol-gel, deposição eletroforética e precipitação biomimética)²¹.

A deposição biomimética da hidroxiapatita à superfície, permite o controle da espessura do recobrimento e potencialização da adesão ao substrato metálico^{3,27,37-38}. A forte adesão osso-implante, mediada pela camada de hidroxiapatita, exige uma ligação química confiável entre o recobrimento e a superfície do implante. Uma das maneiras de se propiciar essa ligação físico-química, é o preparo prévio da superfície por ablação a laser³⁴.

O feixe de laser aumenta a temperatura da superfície do titânio até o ponto de fusão seguido de um rápido resfriamento, resultando em uma microestrutura complexa, com grande aumento de dureza, resistência à corrosão, alto grau de pureza, e formação de uma camada de óxido de titânio espessa e regular^{12,18}. O TiO_2 formado na superfície do Ti cp torna viável a criação de uma forte adesão da camada de apatite ao implante, devido à grade afinidade entre o TiO_2 e a HA²³. Dessa forma, por meio de um processo bioquímico envolvendo o TiO_2 e os íons de Ca e P, torna-se possível a obtenção uma camada de revestimento estável de hidroxiapatita fortemente ligada a superfície do implante de titânio, com potencial para uso clínico^{15,48}.

Modificações de superfície de implantes e a osseointegração: Revisão de Literatura

INTRODUÇÃO

As características químicas dos implantes diferem de acordo com a composição do titânio utilizado e o tratamento de superfície. A composição química e a carga iônica estão intimamente relacionadas à absorção de proteínas e fixação das células. Os implantes são constituídos por titânio comercialmente puro ou variações de ligas. O titânio comercialmente puro (Ti cp) tem vários graus de pureza (Graduada de I a IV), diferenciando-se pelo teor de oxigênio, carbono e ferro, o que reflete nas propriedades mecânicas de cada um. Ligas de titânio são geralmente compostas por Ti6Al4V (liga de titânio grau V), tendo maior resistência mecânica que o Ti cp. (1)

As características da superfície dos implantes de titânio também estão relacionadas à sua hidrofilia. Atualmente, estudos têm demonstrado resultados favoráveis às superfícies hidrofílicas em relação às hidrofóbicas, tendo em vista o favorecimento nas interações com fluidos biológicos, células e tecidos. (2-3)

Muito tem se estudado sobre os fatores que contribuem para a formação e adaptação óssea ao redor dos implantes, como os fatores de crescimento, biomoléculas sinalizadoras e a tecnologia de superfície. As características de superfície dos implantes influenciam significativamente a formação e manutenção do tecido ósseo em contato. (4)

Diferentes autores têm demonstrado que os níveis de osseointegração estão relacionados com o grau de rugosidade de superfície. O aumento da rugosidade superficial favorece a interação mecânica entre as

macromoléculas da superfície do implante e o osso, o que resulta em um aumento na resistência à compressão, tensão e cisalhamento. A rugosidade superficial, correlacionada a uma alta energia de superfície, também estimula uma osseointegração mais rápida e forte pelo fato de as biomoléculas teciduais se adaptarem mais firmemente à superfície do implante (5).

Susuki et al. (1997) avaliaram a atividade de remodelamento ósseo em implantes de titânio com diferentes rugosidades de superfície. A análise histomorfométrica mostrou que o volume ósseo e o contato direto osso-implante foi maior para os rugosos que para os usinados após 42 semanas de implantação. O contrário se observou em relação ao grau de remodelação na superfície óssea de contato, a qual se mostrou menor nos implantes rugosos que nos usinados após 6 semanas de implantação, não havendo diferença após esse período. Segundo os autores, o maior volume ósseo nos implantes de superfície rugosa é devido à menor atividade de remodelação nos estágios iniciais após a implantação, quando comparados aos implantes usinados, sendo portanto a rugosidade do titânio um dos fatores que ajudam a determinar o balanço entre a formação e reabsorção óssea durante o processo de remodelação na interface osso-implante.(6)

Cooper (2000) realizou uma revisão de literatura pela qual encontrou que pelo menos cinco fatores são atribuídos ao aumento da rugosidade superficial: (1) aumento da superfície de contato osso-implante, (2) favorecimento da adesão celular à superfície, (3) aumento da quantidade óssea em contato com a superfície, (4) aumento da interação biomecânica do implante com o osso, e (5) inflamação da mucosa peri-implantar se a superfície rugosa for exposta ao meio bucal.(7)

Desde que foi observado que a alteração das características de superfície exerce significativa influência sobre interface osso-implante, várias estratégias têm sido empregadas para modificar a textura e então aumentar a área da superfície do implante, com o objetivo de potencializar a reação entre o osso e o implante. Atualmente, estudos têm apontado para atuação na superfície dos implantes em nível nanométrico, se mostrando como forte tendência na evolução dos implantes. As características da superfície dos implantes de titânio podem ser modificadas por métodos de adição (plasma spray de titânio, plasma spray de HA) para aumentar a área de superfície e proporcionar uma macrotopografia mais complexa, e por métodos de subtração (jateamento, ataque ácido, oxidação anódica e tratamento por laser) os quais têm sido utilizados para aumentar a área da superfície alterando a micro-topografia, ou textura, da superfície.(8)

Esta revisão tem por objetivo descrever os métodos de modificação de superfície mais utilizados até o momento para a potencialização do processo de osseointegração dos implantes de titânio, bem como os diferentes métodos em estudo no momento, que surgem com resultados promissores e possibilidade de aplicação na implantodontia em um futuro próximo .

1. Modificação por Plasma-Spray de Titânio (TPS)

O método de plasma-spray de titânio consiste na injeção de pó de titânio em uma chama de plasma em alta temperatura, dessa forma, as partículas são projetadas sobre a superfície dos implantes, onde condensam e se fundem, formando uma camada que varia de 40-50 µm de espessura. (9)

Os resultados dos estudos que investigam os possíveis benefícios da superfícies TPS chegaram a diferentes conclusões. Em três estudos em animal realizados por Vercaine et al. (1998), não foi observada correlação entre a rugosidade da superfície e a incorporação do implante. Foram testados implantes com recobrimento por TPS de diferentes rugosidades (Ra) variando entre 16 e 40 μm . Implantes jateados com Al_2O_3 (Ra 4.7 μm) foram utilizados como controle. Após 3 meses de implantação, não foram encontradas diferenças no contato osso-implante e na força de arrancamento, sendo os resultados relacionados ao alto grau de rugosidade, podendo não ter exercido o benefício adicional esperado.(10-12)

Outros estudos no entanto, observaram a superfície TPS melhor integradas ao osso quando comparadas à implantes mais lisos. Gotfredsen et al. (2000) comparou implantes usinados (Ra 0,37 μm), jateados por TiO_2 de três diferentes rugosidades (Ra 1,05, 1,16 e 1,45 μm) e superfície TPS (Ra3,54 μm). Os implantes foram inseridos em tíbia de coelho e avaliados em 6, 9 e 12 semanas. Implantes TPS e jateados, apresentaram torque de remoção significativamente maior do que os implantes usinados.(13)

Suzuki et al. (1997) comparou implantes de superfície TPS (Ra 0,7 μm) e usinada (Ra 4 μm). Foi encontrado maior contato ósseo com a superfície de implantes TPS em relação aos implantes de superfície usinada. Os autores sugerem que os resultados encontrados estão relacionados a um menor grau de remodelação ao redor dos implantes rugosos comparados aos de superfície usinada.(6)

Em estudo clínico, Ledermann et al., relataram um caso de análise histológica de quatro implantes de plasma spray de titânio (TPS) após 12 anos

de carga funcional em um paciente de 95 anos. Após a implantação, os implantes foram conectados à uma barra que suportava uma overdenture. A análise histológica dos implantes revelou excelente osseointegração tanto no osso cortical quanto no medular. Pela análise histomorfométrica, foi observado contato osso-implante variando entre 70% a 80%, sendo que próximo à superfície dos implantes, havia sinais de remodelamento. Os autores concluíram que os implantes de TPS possibilitam o carregamento imediato, com sucesso satisfatório a longo prazo.(14). Contrariamente, outros estudos clínicos consideram que a superfície TPS tem sido relacionada a uma maior reabsorção óssea do que outras superfícies com rugosidade mínima ou moderada. (15-18) Atualmente, há um consenso sobre as vantagens clínicas na utilização de implantes com superfície moderadamente rugosa (na escala micrométrica) ao invés de usar implantes com superfície de plasma-spray de titânio.(9, 19)

2. Modificação por Plasma Spray de Hidroxiapatita (HA)

Do ponto de vista comercial, o método mais utilizado para o recobrimento de implantes de titânio por CaP tem sido o plasma-spray de Hidroxiapatita. O recobrimento por hidroxiapatita (HA), tem sido utilizado desde meados da década de 1980 (16), apresentando propriedades biológicas interessantes.(20-21)

Torensma et al. (2003), avaliaram a seletividade de células do estroma do osso medular, pelos implantes revestidos por HA. Os autores observaram que a HA é seletiva no recrutamento das células do osso medular, explicando as diferenças encontradas *in vivo* para esse recobrimento quando comparada ao titânio e que, essa seletividade celular trás vantagens nos casos em que uma

ampla variedade de células é capaz de aderir ao implante, porém com baixa efetividade no processo de osseointegração.(22)

Uehara et al. (2004), relataram um caso de evidencia histológica da osseointegração em 2 implantes removidos de um paciente que sofreu fratura do parafuso e conexão em acidente automobilístico. A análise revelou que um tecido ósseo denso estava em íntimo contato com a superfície do implante de HA, e que o espaço entre as espiras do implante estava preenchido por osso mineralizado. Os autores concluíram que evidências histológicas mostraram um alto grau de osseointegração nos dois implantes dentais recobertos por HA após carga funcional de 18 meses.(23)

Apesar do tratamento de pacientes com implantes recobertos por HA estar bem estabelecido, sua previsibilidade clínica ainda continua controversa. De acordo com levantamento feito por Biesbrock e Edgerton, estudos clínicos sugerem que os implantes recobertos por HA possuem uma taxa de sobrevivência pequena a curto prazo (variando de 6 meses a 6 anos) quando comparadas aos implantes com superfície de titânio, tendo como principais problemas a facilitação da adesão bacteriana, fratura do recobrimento e dissolução da HA. Por outro lado, os resultados clínicos demonstram que os implantes recobertos por HA podem ser utilizados como uma alternativa interessante em condições específicas como: (1) em osso tipo IV, (2) em sítios de extração imediata, (3) em enxertos maxilares e/ou de seio nasal, ou (4) quando necessário utilizar implantes curtos (menor ou igual a 10mm). Mas apesar disso, os autores relatam que estudos a longo prazo são necessários para validar essas observações.(24)

Gotfredsen et al., avaliaram histométrica e biomecanicamente a ancoragem de implantes jateados com TiO_2 , recobertos por HA e usados instalados nas tíbias de coelhos. Os autores relataram que pela análise histológica foi observado que a HA se mostrava frequentemente fraturada na porção inferior das espiras, e que em 12 semanas a quantidade de HA presente na superfície era menor que em 3 semanas de implantação, sugerindo sua biodegradação.(25)

Piattelli et al. avaliaram o comportamento de implantes de titânio revestidos por HA através da análise das fosfatases alcalina (ACP) e ácida. Quando observada após 6 meses, em várias áreas em contato com o espaço medular, a HA estava completamente reabsorvida. Os resultados histológicos e histoquímicos apontaram dois tipos de células ACP positivas: multinucleadas, frequentemente em processo de fagocitose de partículas de HA, e mononucleares, com morfologia similar à osteoclastos. Os autores concluíram que as áreas onde a HA estava completamente reabsorvida não estavam recobertas por osso, e que este fato estaria relacionado à presença de células mononucleadas, semelhantes à osteoclastos, no espaço medular, sendo estas responsáveis pela falta de osso nessas regiões. (26)

A baixa confiabilidade a longo prazo, tem motivado a busca por diferentes metodologias de recobrimento biotivo da superfície de implantes, sendo alguns destes descritos adiante.

3. Modificação por Jateamento

Outra abordagem para a rugosidade da superfície de titânio consiste no jateamento de implantes com duras partículas cerâmicas ou de titânio. As

partículas são projetadas em alta velocidade por meio de ar comprimido. Dependendo do tamanho das partículas, diferentes rugosidades de superfície podem ser produzidas em implantes de titânio. O material de jateamento deve ser quimicamente estável, biocompatível e não deve prejudicar a osseointegração dos implantes. Várias partículas têm sido utilizadas, tais como alumina, óxido de titânio e partículas de fosfato de cálcio.(27-28)

Alguns estudos de superfícies jateadas encontraram indicações de uma ótima rugosidade. Wennerberg et al. (1995, 1996, 1997, 1998) comparou superfícies jateadas de diferentes rugosidades (Sa 0,6-2,1 μm) com implantes de superfície usinada. As superfícies jateadas apresentaram uma resposta óssea mais intensa do que os implantes usinados, após até 1 ano de implantação em osso de coelho. A resposta óssea mais evidente, em termos de pico de torque de remoção e contato osso-implante, foi encontrada pela superfície jateada com valor de Sa 1,5 μm , apresentando aumento na área de superfície de 50%.(29-35)

Duyck et al. (2007) Comparou implantes usinados (Ra de 0,45) com implantes jateados (Ra 2,75 μm). Os autores demonstraram que o carregamento dos implantes não afetou a formação óssea nas diferentes superfícies, mas que um efeito de estimulação pode ser observado no tecido ósseo ao redor dos implantes rugosos.(36)

Buser et al. (1991), avaliaram a influência de seis diferentes superfícies (eletropolida – E, jateadas com partículas médias e condicionadas por ácido – SMP, jateadas com partículas grandes – SL, jateadas com partículas grandes e condicionadas por ácido – SLA, plasma spray de titânio – TPS e plasma spray de hidroxiapatita – HA) instaladas na metáfise tibial e fêmur de mini pigs. As

maiores porcentagens de contato osso-implante foram observadas nas superfícies SLA (50-60%) e HA (60-70%). Apesar disso, o recobrimento de HA mostrou sinais consistentes de reabsorção. A porcentagem de BIC da HA só não foi estatisticamente maior em relação à SLA, a qual não teve BIC% estatisticamente superior à TPS. A superfície TPS só não teve diferença significativa de BIC% em relação à superfície SL. As superfícies SL, SMP e E, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes de BIC% entre si. Segundo os autores, as superfícies SLA e HA foram as mais promissoras.(9)

Em um estudo prospectivo de 5 anos, Wennström et al. (2004) compararam implantes Astra Tech com superfícies usinadas e jateadas por TiO₂ em pacientes suscetíveis a periodontite. Eles obtiveram mínima perda óssea para as superfícies modificadas, sem diferenças entre elas.(37).

Karlsson et al. (1998) compararam implantes TiOBlast da Astra Tech com implantes usinados da Astra Tech e não encontraram nenhuma diferença na taxa de sobrevivência ou na perda de osso marginal após 2 anos de carregamento.(38)

Implantes jateados por TiO₂ foram avaliados por até 3 anos (média de seguimento de 2,3 anos) em um estudo publicado por Warren et al. (2002). Este estudo retrospectivo incluiu 102 implantes instalados em 48 pacientes. A reabsorção óssea marginal de <1 mm foi encontrada, sendo inferior à esperada.(39)

4. Modificação por ataque ácido

O titânio é um metal resistente à corrosão, no entanto alguns ácidos podem ser usados para criar porosidades removendo uma pequena quantidade

de material, modificando assim a superfície por subtração. Ácidos como HCl, H₂SO₄ e HF são exemplos de agentes químicos freqüentemente utilizados para o condicionamento do titânio.

A técnica de ataque ácido tem sido avaliada em vários estudos. Implantes usinados da Nobel Biocare, foram comparados com implantes modificados por duplo ataque ácido OSSEOTITE (3i Implant Innovations) em um estudo clínico retrospectivo realizado por Al-Nawas et al. (2007). Após 49 meses, não houve diferença significativa na taxa de sobrevida. No entanto, para os pacientes tratados com uso de biomateriais, a quantidade de implantes usinados perdidos foi maior do que os implantes com superfície tratada por duplo ataque ácido.(40)

Khang et al. (2001) compararam implantes usinados e modificados por duplo ataque ácido. Noventa e sete pacientes e 432 implantes foram incluídos no estudo. Após 36 meses de implantação, o índice de sucesso obtido foi de 95% para os implantes com duplo ataque ácido e 86,7% para os implantes usinados, com diferença estatística correlacionada às características da superfície.(5).

Em 2002, Vernino et al. avaliaram o efeito da carga precoce de implantes condicionados por ácido (Osseotite®) implantados em macacos. Os autores observaram que a redução no tempo de cicatrização de 2 para 1 mês, não afetou estatisticamente a quantidade de tecido ósseo na interface osso-implante, e que esse sucesso provavelmente deve-se à aceleração do processo de cicatrização decorrente da utilização de implantes com superfície tratada por duplo ataque ácido (Osseotite®).(41)

Trisi et al. (2003), avaliaram o contato osso-implante (BIC) de implantes com duplo condicionamento ácido e usinados, após 2 meses de osseointegração

na região posterior de maxila. O tecido ósseo ao redor da superfície condicionada por ácido se apresentou lamelar, com o osso trabecular se projetando dentro e entre as espiras. No lado usinado, o osso se apresentou normalmente em contato com a ponta das espiras. Baseados nos resultados histomorfométricos, os autores concluíram que, após 2 meses de cicatrização na maxila posterior, os implantes condicionados por duplo ataque ácido são capazes de receber carga funcional.(42)

Em 2003, Stach e Kohles avaliaram, por Meta - Análise, o índice de sucesso de implantes usinados e condicionados por duplo ataque ácido (Osseotite®). Os dados derivados de dezoito estudos prospectivos e multicentro, mostraram que a qualidade óssea parece ter grande impacto sobre os implantes usinados, sendo que o mesmo efeito não é observado para os implantes Osseotite, sendo portanto uma vantagem no sucesso a longo prazo em áreas de baixa qualidade óssea. (43)

Veis et al. (2004), avaliaram histologicamente a porcentagem do contato osso implante (BIC%) da superfície Osseotite® e usinada em área enxerto ósseo autógeno particulado. Os implantes Osseotite foram estatisticamente superiores aos usinados tanto na região regenerada ($p=0,000004$) como no osso basal ($p=0,0043$), sendo seu uso considerado clinicamente relevante para os casos de implantação imediata ou em áreas de extração.(44)

5. Modificação pela combinação de Jateamento e Ataque Ácido

A combinação de jateamento e condicionamento tem sido uma técnica de modificação de superfície bastante utilizada na última década. A razão para a combinação dos métodos, está no fato de que o processo de jateamento,

hipoteticamente, propicia uma rugosidade ideal para fixação mecânica enquanto o condicionamento ácido suaviza alguns picos agudos além de adicionar um perfil de alta frequência na superfície com potencial interessante para a adesão de proteínas, consideradas importantes para os estágios iniciais da neoformação óssea. O primeiro estudo in vivo foi publicado por Buser et al. (1991). Eles compararam superfícies eletropolida, jateadas com condicionamento ácido (SLA) e implantes recobertos por HA com valores de Ra variando de 0,6 a 50 μm . As superfícies com jateamento+ ácido, demonstram maior quantidade de contato osso-implante, embora não tenha sido a mais rugosa.(9)

Em um estudo posterior, Buser et al. (1998, 1999) compararam implantes usinados(Ra 0,15 μm), duplo ataque ácido(Ra 1,3 μm) e TPS (Ra 3.1 μm) com implantes tratados por jateamento + ataque ácido (Ra 2 μm), instalados em suínos. O torque de remoção foi significativamente maior para os implantes jateados + ácido. A interpretação dos resultados indica que uma rugosidade ótima existe para as superfícies jateadas + ataque ácido ou que a micro rugosidade adicional à superfície pode ser mais importante que a variação na intensidade da rugosidade. (45-46)

Szmukler-Moncler et al. (2004) compararam implantes jateados+ácido (SLA) e usinados+ ataque ácido,com a intenção de se avaliar a influência do jateamento prévio ao ataque ácido. Após 10 semanas de implantação em suínos, foi observado um torque de remoção significativamente maior para os SLA. A rugosidade superficial mensurada foi de Ra de 0,90 μm para os implantes usinados+ ataque ácido e de Ra de 1,53 μm para SLA, sendo este fator considerado o responsável pela diferença nos resultados obtidos. (47) Por outro lado, Kawahara et al. (2006), não encontraram diferenças quanto à

migração celular, entre superfícies modificadas por ataque ácido (R_a 0,4 μm) e jateadas+ ataque ácido (R_a 2 μm). (48-49).

Micro-implantes usinados (R_a 0.3 μm) e jateados + ataque ácido (R_a 0.7 μm) foram avaliados em humanos por Grassi et al. (2006). Após 2 meses de implantação (sem carregamento) os implantes com superfície jateada + ataque ácido apresentaram estatisticamente maior contato osso-implante que os usinados. (50)

Tendências recentes têm sugerido para mudanças no perfil de hidrofília da superfície SLA. Buser et al. (2004) utilizaram implantes com superfície jateada + ataque ácido (S_a 1,16 μm) comparando a implantes com a mesma superfície mas que, além disso, foram submersos em NaCl (S_a 1,16 μm). Maior contato osso-implante foi encontrado após 2 e 4 semanas, em minipigs, na superfície hidrofílica. Após 8 semanas, nenhuma diferença foi ser observada. (2)

6. Modificação por Oxidação Anódica

Todos os implantes de titânio têm uma camada de óxido nativa, mas implantes oxidados são preparados com uma camada de óxido mais espessa, normalmente obtida por tratamento térmico ou com o implante colocado como um ânodo em uma célula galvânica com um eletrólito adequado. Depois de passar corrente através da célula galvânica, a superfície de óxido cresce a partir do estado original com espessura de cerca de 5 nm atingindo 1 μm ou mais. Uma correlação positiva entre a variação na espessura e o aumento na incorporação do implante e foi encontrado por Choi et al. (2006), quando investigaram implantes anodizados preparados em diferentes tensões. Implante anodizado com 500 V tinha um R_a de 5,2 μm , preparado com 550 V tinha um R_a

de 3,8 μm , 300 V tinha um Ra de 0,8 μm e 400 V um Ra de 1,7 μm . Os autores observaram maior torque de remoção e maior contato osso-implante para os implantes preparados com voltagem de 500-550V, em comparação com 300 e 400 V.(51)

Sul et al. (2001, 2002, 2005, 2006)(52-57) e Sul (2003)(58) investigaram, em uma série de estudos, a influência da química de superfície em relação aos processos de oxidação utilizando diferentes ácidos como eletrólitos, a fim de aumentar a biotividade da superfície. Eletrólitos contendo P, S, Ca e Mg, alteraram a composição química e a topografia. Implantes usinados foram utilizados como controle. Os implantes quimicamente modificados demonstraram maior torque de remoção e maior contato osso-implante do que os controles, especialmente as superfícies reforçadas por Ca e Mg mostraram osseointegração significativamente maior.

Zechner et al. em 2003, compararam as características histológicas e histomorfométricas da cicatrização óssea de implantes com superfície modificada por oxidação anódica, usinadas e recobertas por HA, em mini-pigs. Os autores observaram que os implantes com superfície anodizada possuem propriedades capazes de proporcionar resultados similares aos implantes revestidos por HA, em regiões de osso tipo II a IV, porém sem reações adversas na interface osso-implante.(59)

Sul et al. (2006) compararam implantes oxidados-Mg com implantes modificados por duplo ataque ácido (OSSEOTITE, 3i, Implant Innovation) e outro implante oxidado (TiUnite, NobelBiocare). Depois de 3 e 6 semanas de implantação em coelhos, os implantes oxidados Mg demonstraram significativamente maior torque de remoção e contato osso-implante que os

OSSEOTITE, mas não houve diferença estatística quando comparada com TiUnite. (53) Sul (2009) também avaliou a superfície oxidada e reforçada com Mg, comparando-a a superfície jateada e usinada. A superfície reforçada por Mg demonstrou maior torque de remoção do que os implantes usinados após 3 e 6 semanas, enquanto os implantes jateados foram superiores apenas após 6 semanas em comparação aos controles.(60)

Huang et al. (2005), avaliaram a formação óssea local e a osseointegração em implantes com superfície de óxido de titânio (TiUnite™) em osso tipo IV da maxila de macacos. Segundo os autores, os resultados sugeriram que a superfície de óxido de titânio (TiUnite™) possui característica osteocondutiva com potencial de promover um alto grau de osseointegração em osso tipo IV.(61)

Rocci et al. (2003) compararam implantes de mesmo design (Nobel Biocare, Göteborg, Suécia) com superfície usinada Brånemark e TiUnite, uma comparação interessante, tendo em vista que este é um dos poucos estudos comparando diferentes superfícies, em que o desenho de implante foi o mesmo. Avaliados em protocolo de carga imediata, os autores encontraram uma taxa de sucesso significativamente maior para os implantes TiUnite em comparação aos usinados.(62) Em um estudo recentemente publicado por Friberg & Jemt (2008), a superfície TiUnite mostrou uma taxa de sobrevivência significativamente maior quando comparado com os implantes usinados Brånemark, em casos de um estágio cirúrgico com 1 ano de acompanhamento.(63)

7. Modificação por Ablação à Laser

A tecnologia de ablação por laser para preparação de superfícies possui diversas aplicações industriais. Este processo resulta na criação de microestrutura na superfície do titânio com considerável aumento na dureza, a resistência à corrosão, um padrão de rugosidade com alto grau de pureza e camada de óxido mais espessa. (64-65)

Estudos *in vivo* e *in vitro*, avaliaram o comportamento biológico dos implantes modificados por laser. Soboyejo et al.(66) verificaram a resposta celular a substratos de titânio condicionados por laser, e observaram que as estrias criadas pelo feixe de laser orientaram a adesão de células osteoprogenitoras e inibiram a migração e crescimento de fibroblastos. Frenkel et al.(67) analisaram o efeito da ablação a laser em câmara de titânio simulando uma resposta óssea ao redor de implantes ortopédicos intramedulares e concluíram que este tratamento de superfície pode induzir um rápido crescimento ósseo e a formação de uma interface osso-implante resistente contribuindo para a longevidade do implante. O mesmo foi encontrado por Li et al.(68) por meio de histologia e teste de arrancamento, sendo observado que a formação óssea nas ranhuras criadas pela ablação a laser aumentou a retenção dos implantes.

Karacs et al.(69) compararam o torque de remoção de implantes usinados, jateados e jateados com posterior ablação a laser da superfície. Eles observaram que o tratamento com laser depois do jateamento aumentou em quase 50% do torque de remoção.

Hallgren et al.(70), usando laser de Nd: YAG, encontram um percentual de contato osso-implante de 40% para os implantes modificados por laser e 32%

para os usinados. O teste de torque de remoção apresentou um valor médio de 52 Ncm para os implantes tratados com laser e 35 Ncm para os implantes usinados, após 12 semanas de implantação. Este resultado foi semelhante ao observado no estudo de Faeda et al. (71) no qual foram comparados implantes usinados e modificados por laser instalados em tíbia de coelhos, sendo observada por torque de remoção a superioridade dos implantes modificados por laser após os períodos de análise de 4, 8 e 12 semanas de implantação. Comportamento semelhante foi encontrado por Cho e Jung.(72) Eles compararam, pelo teste de torque de remoção, implantes usinados e com superfície modificada por laser após 8 semanas de implantação. O valor do torque de remoção foi de $23,58 \pm 3,71$ Ncm para os implantes usinados e $62,57 \pm 10,44$ Ncm para os implantes modificados por laser.

Avaliando em humanos a superfície modificada por ablação a laser, Shibli et al. (73) instalaram em maxila posterior (osso tipo IV) micro-implantes usinados, jateados com ataque ácido e modificados por laser. Após 8 semanas de implantação, foi observada por histometria a superioridade estatística dos implantes jateados+ácido e modificados por laser quando comparados aos usinados, não havendo diferença entre os modificados por laser e jateados com posterior ataque ácido.

8. Tendências futuras para modificação das superfícies dos implantes

Alguns conceitos e técnicas abordadas em estudos recentes, devem ser consideradas a fim de melhorar, tanto a curto quanto a longo prazo a osseointegração de implantes de titânio. Estas dizem respeito a tendências futuras nas modificações da rugosidade da superfície em escala nanométrica

para promover a absorção de proteínas e adesão celular, revestimentos biomiméticos a base de fosfato de cálcio para melhorar osteocondução e a incorporação de medicamentos capazes de acelerar o processo de cicatrização óssea na área peri-implantar.

8.1 Rugosidade de superfície em nível nanométrico

Atualmente, a nano-tecnologia tem se mostrado com grande potencial para a área biológica, possibilitando atuar no mecanismo de interação entre os biomateriais e tecidos.

Os eventos que se iniciam após a inserção dos implantes, são em parte ditados pelas biomoléculas que interagem com a superfície do material.(74) Atualmente, a maioria dos implantes comercializados são moderadamente rugosos na escala micrométrica(75); no entanto, pouca atenção tem sido dada à análise de implantes com superfície nanométrica. A influencia, *in vitro*, da nanoestrutura na ativação celular tem sido demonstrada com diferentes tipos celulares(76), o que indica que a nanotopografia de superfície pode modular a formação tecidual inicial. (77)

Estudos experimentais *in vitro* (78-79) têm demonstrado que a adesão de células osteoblásticas foi maior em estruturas de escala submicrométrica mas não em superfícies lisas. Uma filopodia melhor desenvolvida foi observada na adesão inicial das células osteoblásticas sobre superfície nanométrica. Estas estruturas nanométricas também podem orientar as células por meio de adesão seletiva dos osteoblastos à superfície do implante. Este processo de adesão seletiva pode resultar na melhoria da cicatrização inicial em torno do implante.

Até então, são poucos implantes de uso clínico que têm utilizado superfície modificada em escala nanométrica para melhorar a resposta óssea, dentre estes o OsseoSpeed (Astra Tech AB). OsseoSpeed (50-100 nm) possui superfície criada por jateamento de óxido de titânio, seguido por modificação química da superfície por tratamento com ácido fluorídrico.(80-81)

Ellingsen et al. (2004) compararam implantes com superfície jateadas por óxido de titânio, a implantes jateados e condicionados com ácido fluorídrico. Eles mostraram que, após 3 meses, os valores de torque de remoção e contato osso implante foram significativamente mais elevados para a superfície modificada por ácido fluorídrico após 1 mês, bem como 3 meses de implantação. Com base nos dados biomecânicos e histomorfométricos os autores concluíram que os implantes tratados com ácido fluorídrico conseguiram uma maior integração ao osso nos períodos iniciais de cicatrização, quando comparados aos implantes de titânio modificados somente por jateamento.(82)

Resultados similares foram encontrados em um estudo de Cooper et al. (2006) em tibia de rato. Neste estudo, implantes jateados por óxido de titânio foram comparados com os implantes que além do jateamento, foram condicionados por ácido fluorídrico. Após 21 dias de implantação, significativamente maior porcentagens de contato osso-implante foi observado nos implantes modificados por ácido fluorídrico. Com base nos dados histomorfométricos, os autores concluíram que os implantes com superfície tratada por ácido fluorídrico resultou em osseocondução na interface osso-implante, com maior formação óssea em período inicial de cicatrização.(81)

A nanotecnologia tem provado ser um caminho de sucesso para acrescentar conhecimento no campo de produção e caracterização de

nanoestruturas da interface tecido-implante. Assim, a implementação de nanoestruturas específicas à superfície do implante pode representar uma alternativa para melhorar a taxa de sucesso dos implantes dentários em casos desfavoráveis e uma maneira de aumentar o conhecimento sobre o fenômeno da osseointegração.

8.2 Recobrimento químico dos implantes por fosfato de cálcio

Do ponto de vista comercial, o método de recobrimento de implantes por CaP mais utilizado até então é o plasma-spray de hidroxiapatita. Apesar do excelente potencial de osseointegração, este recobrimento apresenta baixa estabilidade, o que compromete seu resultado a longo prazo. Com a intenção de utilizar os benefícios biológicos dos recobrimentos por CaP, mas de maneira mais estável e previsível, diferentes métodos de deposição têm sido propostos na última década, entre eles, pulverização, sol-gel, eletroforético, biomimético entre outros. (83)

Pelo método biomimético, a superfície de titânio é recoberta pela precipitação de fosfato de cálcio em cristais de apatita sobre a superfície de titânio em fluidos corpóreo simulado (SBF) e temperatura ambiente. A fim de acelerar a deposição do revestimento em soluções aquosas, variações na técnica podem ser adotadas.

Uma delas envolve a eletrodeposição de fosfato de cálcio, utilizando uma corrente elétrica, um catodo de titânio e um ânodo de platina.(84-85) Este método eletroquímico é geralmente realizado em soluções de fosfato de cálcio e ácido, levando à formação de revestimento convertidos em apatita pela transformação hidrotermal. A deposição eletroquímica realizada em SBF

tamponado em pH neutro pode produzir uma camada de apatita carbonatada diretamente sobre a superfície de titânio. (86) Este método torna possível o controle perfeito da espessura do depósito em todos os tipos de superfícies complexas. O tempo necessário para o recobrimento é curto e o processo apresenta alta reprodutibilidade e eficácia. (87)

Outra metodologia é baseada na precipitação biomimética de fosfato de cálcio sobre superfícies de titânio por imersão em SBF. Este método envolve a nucleação e crescimento de cristais de apatita na superfície do implante em temperaturas e pH fisiológico. A nucleação heterogênea e crescimento do P-Ca na superfície do titânio é iniciada pela ligação química entre núcleos nanométricos, formando uma matriz interfacial desestruturada, estabilizada pela presença de íons de magnésio. (88) A estabilidade mecânica do revestimento P-Ca requer uma superfície de titânio rugosa para assegurar a estabilidade mecânica do revestimento.

Assim como a superfície OsseoSpeed com nano-topografia, a superfície NanoTite (3i Implant Innovations), a qual é obtida pelo recobrimento do implantes por nanopartículas CaP com mínima rugosidade, está atualmente disponível para uso clínico. Essa superfície tem sido descrita como sendo criada por uma discreta deposição cristalina de CaP pelo método sol-gel (DCD) com uma cobertura de superfície de aproximadamente 50%. (89)

Dados histomorfométricos em humanos de estudo prospectivo, randomizado, controlado, duplo-cegos são muito limitados. Orsini et al. (2007) comparou implantes com superfície DCD e modificada por duplo ataque ácido (DAE) instalados na maxila posterior de humanos. Depois de um tempo de cicatrização médio de 8 ± 1 semanas, a média de contato osso-implante foi de

32% para a superfície DCD e 19% para o DAE. Essa diferença foi estatisticamente significativa. Os autores concluíram que o tratamento DCD aumentou a osseointegração da superfície do implante, durante os primeiros 2 meses após a colocação do implante. Além disso, eles sugeriram que a modificação da superfície por DCD pode levar a um menor período de cicatrização após a colocação do implante, proporcionando estabilidade precoce minimizando micro-movimentações, possibilitando o carregamento precoce e a restauração da função em áreas de baixa densidade óssea. (90)

Os resultados da Goenê et al. (2007) apontam na mesma direção. Em um estudo em humanos, implantes com superfície DCD e DAE foram instalados na região posterior de maxila. Após 4 semanas, não houve diferença significativa entre os implantes DCD e DAE. Após 8-12 semanas, a média de contato osso-implante foi de 45% para DCD e 18% para os implantes DAE. Concluiu-se que a modificação DCD parece ter um efeito significativo no desenvolvimento de novo tecido ósseo após a colocação do implante.(91) Como ambos os trabalhos sugerem, essa superfície pode ter importância clínica significativa para a reabilitação com implantes em áreas com baixa densidade óssea.

8.3 Incorporação de drogas bioativas à superfície dos implantes de titânio

A superfície dos implantes dentais de titânio pode ser revestida por agentes estimuladores da formação óssea, como os fatores de crescimento, a fim de melhorar o processo de formação óssea local. Membros da superfamília dos fatores de crescimento transformadores (TGF- β), e em particular as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), TGF- β 1, fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento semelhante à insulina

(IGF-1 e 2) são algumas das opções mais promissoras para essa finalidade. Dados experimentais, em que as BMPs foram incorporadas a implantes dentários, foram obtidos a partir de uma variedade de metodologias. (92-95) O fator limitante é que o produto ativo tem que ser liberado de forma progressiva e não de uma só vez. Outra possibilidade pode ser a adição de um plasmídeo contendo o gene codificador da BMP. (96) Esta possibilidade é limitada devido a pouca eficácia da inserção de plasmídeos nas células e a expressão da proteína. Além disso, a superprodução de BMPs por células pode não ser desejável, após o processo de cicatrização óssea.

A superfície dos implantes também pode ser carregada com moléculas que controlam o processo de remodelação óssea. Incorporação de medicamentos anti-reabsorção óssea, tais como bisfosfonados, pode ser relevante em casos clínicos de pouco suporte ósseo, por exemplo, rebordos alveolares muito reabsorvidos ou tecido ósseo de baixa densidade. Já foi demonstrado que a incorporação de bisfosfonado à superfície de implantes de titânio pode aumentar a densidade óssea local na região peri-implantar. O efeito da droga anti-reabsorção parece limitar-se à proximidade do implante.

Estudos experimentais in vivo demonstraram a ausência de efeitos negativos, mas apenas um ligeiro aumento na osseointegração de implantes dentários foi observado. (97-98) Outros estudos experimentais utilizando implantes revestidos por plasma-spray de HA imersos em pamidronato ou zolendronato demonstraram um aumento significativo na área de contato ósseo. (99-100). O principal problema reside na liberação constante da droga. Devido à alta afinidade química dos bisfosfonados à superfície de fosfato de cálcio, a incorporação da droga à superfície dos implantes pode ser obtida através do

método de recobrimento biomimético em temperatura ambiente.(100) Contudo, a dose ideal da droga e seu efeito cumulativo é um fator crítico a ser considerado, uma vez que diversos estudos têm demonstrado a ocorrência de necrose óssea relacionada à alta concentração da droga no tecido ósseo. (101)

CONCLUSÃO

Existe uma enorme variedade de superfícies de implantes disponíveis no mercado, a maioria dessas com eficácia clínica comprovada (>95%). No entanto, muitas destas não apresentam estudos experimentais e clínicos padronizados a longo prazo. O papel exato da química e da topografia da superfície sobre os eventos iniciais da osseointegração bem como sua manutenção a longo prazo, ainda permanece com algumas incertezas. O entendimento sobre a maneira com que as proteínas e os diferentes tipos celulares interagem com a superfície, parece ser o caminho para se determinar a morfologia, rugosidade ou química ideal da superfície. A liberação controlada de drogas capazes de estimular a formação óssea ou controlar sua reabsorção na região peri-implantar, possivelmente nortearão uma nova geração de implantes, capazes de auxiliar em casos de difícil resolução clínica.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. Steinemann SG. Titanium--the material of choice? Periodontology 2000. 1998;17(Jun):7-21.

2. Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res*. 2004 Jul;83(7):529-33.
3. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Jul 1;74(1):49-58.
4. 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.
5. Khang W, Feldman S, Hawley CE, Gunsolley J. A multi-center study comparing dual acid-etched and machined-surfaced implants in various bone qualities. *J Periodontol*. 2001 Oct;72(10):1384-90.
6. Suzuki K, Aoki K, Ohya K. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rabbits. *Bone*. 1997 Dec;21(6):507-14.
7. Cooper LF. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent*. 2000 Nov;84(5):522-34.
8. Faeda RS, Tavares HS, Sartori R, Guastaldi AC, Marcantonio E, Jr. Biological performance of chemical hydroxyapatite coating associated with implant surface modification by laser beam: biomechanical study in rabbit tibias. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Aug;67(8):1706-15.

9. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1991 Jul;25(7):889-902.
10. Vercaigne S, Wolke JG, Naert I, Jansen JA. Histomorphometrical and mechanical evaluation of titanium plasma-spray-coated implants placed in the cortical bone of goats. *J Biomed Mater Res*. 1998 Jul;41(1):41-8.
11. Vercaigne S, Wolke JG, Naert I, Jansen JA. Bone healing capacity of titanium plasma-sprayed and hydroxylapatite-coated oral implants. *Clin Oral Implants Res*. 1998 Aug;9(4):261-71.
12. Vercaigne S, Wolke JG, Naert I, Jansen JA. The effect of titanium plasma-sprayed implants on trabecular bone healing in the goat. *Biomaterials*. 1998 Jun;19(11-12):1093-9.
13. Gotfredsen K, Berglundh T, Lindhe J. Anchorage of titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2000;2(3):120-8.
14. Ledermann PD, Schenk RK, Buser D. Long-lasting osseointegration of immediately loaded, bar-connected TPS screws after 12 years of function: a histologic case report of a 95-year-old patient. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1998 Dec;18(6):552-63.
15. Astrand P, Engquist B, Anzen B, Bergendal T, Hallman M, Karlsson U, et al. Nonsubmerged and submerged implants in the treatment of the

partially edentulous maxilla. Clin Implant Dent Relat Res. 2002;4(3):115-27.

16. Becker W, Becker BE, Ricci A, Bahat O, Rosenberg E, Rose LF, et al. A prospective multicenter clinical trial comparing one- and two-stage titanium screw-shaped fixtures with one-stage plasma-sprayed solid-screw fixtures. Clin Implant Dent Relat Res. 2000;2(3):159-65.

17. Roynesdal AK, Ambjornsen E, Haanaes HR. A comparison of 3 different endosseous nonsubmerged implants in edentulous mandibles: a clinical report. Int J Oral Maxillofac Implants. 1999 Jul-Aug;14(4):543-8.

18. Roynesdal AK, Ambjornsen E, Stovne S, Haanaes HR. A comparative clinical study of three different endosseous implants in edentulous mandibles. Int J Oral Maxillofac Implants. 1998 Jul-Aug;13(4):500-5.

19. Ong JL, Carnes DL, Bessho K. Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. Biomaterials. 2004 Aug;25(19):4601-6.

20. Lee JJ, Rouhfar L, Beirne OR. Survival of hydroxyapatite-coated implants: a meta-analytic review. J Oral Maxillofac Surg. 2000 Dec;58(12):1372-9; discussion 9-80.

21. Sun L, Berndt CC, Gross KA, Kucuk A. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review. J Biomed Mater Res. 2001;58(5):570-92.

22. Torensma R, ter Brugge PJ, Jansen JA, Figdor CG. Ceramic hydroxyapatite coating on titanium implants drives selective bone marrow stromal cell adhesion. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Oct;14(5):569-77.
23. Uehara T, Takaoka K, Ito K. Histological evidence of osseointegration in human retrieved fractured hydroxyapatite-coated screw-type implants: a case report. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Oct;15(5):540-5.
24. Biesbrock AR, Edgerton M. Evaluation of the clinical predictability of hydroxyapatite-coated endosseous dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995 Nov-Dec;10(6):712-20.
25. Gotfredsen K, Wennerberg A, Johansson C, Skovgaard LT, Hjorting-Hansen E. Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: an experimental study with rabbits. *J Biomed Mater Res.* 1995 Oct;29(10):1223-31.
26. Piattelli A, Scarano A, Di Alberti L, Piattelli M. Histological and histochemical analyses of acid and alkaline phosphatases around hydroxyapatite-coated implants: a time course study in rabbit. *Biomaterials.* 1997 Sep;18(17):1191-4.
27. Aparicio C, Gil FJ, Fonseca C, Barbosa M, Planell JA. Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications. *Biomaterials.* 2003 Jan;24(2):263-73.

28. Ivanoff CJ, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO(2) blasted and turned titanium microimplants in humans. Clin Oral Implants Res. 2001 Apr;12(2):128-34.
29. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B. Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminum oxide. Int J Oral Maxillofac Implants. 1996 Jan-Feb;11(1):38-45.
30. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. Clin Oral Implants Res. 1995 Mar;6(1):24-30.
31. Wennerberg A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B. Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. Biomaterials. 1996 Jan;17(1):15-22.
32. Wennerberg A, Albrektsson T, Lausmaa J. Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25- and 75-microns-sized particles of Al₂O₃. J Biomed Mater Res. 1996 Feb;30(2):251-60.
33. Wennerberg A, Ektessabi A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B. A 1-year follow-up of implants of differing surface roughness

placed in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997 Jul-Aug;12(4):486-94.

34. Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Implants Res*. 1998 Feb;9(1):11-9.

35. Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Sawase T, Lausmaa J. Surface characterization and biological evaluation of spark-eroded surfaces. *J Mater Sci Mater Med*. 1997 Dec;8(12):757-63.

36. Duyck J, Slaets E, Sasaguri K, Vandamme K, Naert I. Effect of intermittent loading and surface roughness on peri-implant bone formation in a bone chamber model. *J Clin Periodontol*. 2007 Nov;34(11):998-1006.

37. Wennstrom JL, Ekestubbe A, Grondahl K, Karlsson S, Lindhe J. Oral rehabilitation with implant-supported fixed partial dentures in periodontitis-susceptible subjects. A 5-year prospective study. *J Clin Periodontol*. 2004 Sep;31(9):713-24.

38. Karlsson U, Gotfredsen K, Olsson C. A 2-year report on maxillary and mandibular fixed partial dentures supported by Astra Tech dental implants. A comparison of 2 implants with different surface textures. *Clin Oral Implants Res*. 1998 Aug;9(4):235-42.

39. Warren P, Chaffee N, Felton DA, Cooper LF. A retrospective radiographic analysis of bone loss following placement of TiO₂ grit-blasted

implants in the posterior maxilla and mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002 May-Jun;17(3):399-404.

40. Al-Nawas B, Hangen U, Duschner H, Krummenauer F, Wagner W. Turned, machined versus double-etched dental implants in vivo. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2007 Jun;9(2):71-8.

41. Vernino AR, Kohles SS, Holt RA, Jr., Lee HM, Caudill RF, Kenealy JN. Dual-etched implants loaded after 1- and 2-month healing periods: a histologic comparison in baboons. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2002 Aug;22(4):399-407.

42. Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, Rao W, Testori T, Porter SS. 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.

43. Stach RM, Kohles SS. A meta-analysis examining the clinical survivability of machined-surfaced and osseotite implants in poor-quality bone. *Implant Dent*. 2003;12(1):87-96.

44. Veis AA, Trisi P, Papadimitriou S, Tsirlis AT, Parissis NA, Desiris AK, et al. Osseointegration of Osseotite and machined titanium implants in autogenous bone graft. A histologic and histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2004 Feb;15(1):54-61.

45. Buser D, Nydegger T, Oxland T, Cochran DL, Schenk RK, Hirt HP, et al. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1999 May;45(2):75-83.

46. 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 Sep-Oct;13(5):611-9.
47. Szmukler-Moncler S, Perrin D, Ahossi V, Magnin G, Bernard JP. Biological properties of acid etched titanium implants: effect of sandblasting on bone anchorage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004 Feb 15;68(2):149-59.
48. Kawahara H, Aoki H, Koike H, Soeda Y, Kawahara D, Matsuda S. No evidence to indicate topographic dependency on bone formation around cp titanium implants under masticatory loading. *J Mater Sci Mater Med*. 2006 Aug;17(8):727-34.
49. Kawahara H, Nakakita S, Ito M, Niwa K, Kawahara D, Matsuda S. Electron microscopic investigation on the osteogenesis at titanium implant/bone marrow interface under masticatory loading. *J Mater Sci Mater Med*. 2006 Aug;17(8):717-26.
50. Grassi S, Piattelli A, de Figueiredo LC, Feres M, de Melo L, Iezzi G, et al. Histologic evaluation of early human bone response to different implant surfaces. *J Periodontol*. 2006 Oct;77(10):1736-43.
51. Choi JW, Heo SJ, Koak JY, Kim SK, Lim YJ, Kim SH, et al. Biological responses of anodized titanium implants under different current voltages. *J Oral Rehabil*. 2006 Dec;33(12):889-97.

52. Sul YT, Jeong Y, Johansson C, Albrektsson T. Oxidized, bioactive implants are rapidly and strongly integrated in bone. Part 1--experimental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Oct;17(5):521-6.
53. Sul YT, Johansson C, Albrektsson T. Which surface properties enhance bone response to implants? Comparison of oxidized magnesium, TiUnite, and Osseotite implant surfaces. *Int J Prosthodont.* 2006 Jul-Aug;19(4):319-28.
54. Sul YT, Johansson C, Byon E, Albrektsson T. The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive titanium implants. *Biomaterials.* 2005 Nov;26(33):6720-30.
55. Sul YT, Johansson C, Wennerberg A, Cho LR, Chang BS, Albrektsson T. Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005 May-Jun;20(3):349-59.
56. Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Roser K, Wennerberg A, Albrektsson T. Oxidized implants and their influence on the bone response. *J Mater Sci Mater Med.* 2001 Oct-Dec;12(10-12):1025-31.
57. Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Wennerberg A, Albrektsson T. Resonance frequency and removal torque analysis of implants with turned and anodized surface oxides. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Jun;13(3):252-9.

58. Sul YT. The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant. *Biomaterials*. 2003 Oct;24(22):3893-907.
59. Zechner W, Tangl S, Furst G, Tepper G, Thams U, Mailath G, et al. Osseous healing characteristics of three different implant types. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Apr;14(2):150-7.
60. Sul YT, Kang BS, Johansson C, Um HS, Park CJ, Albrektsson T. The roles of surface chemistry and topography in the strength and rate of osseointegration of titanium implants in bone. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Jun 15;89(4):942-50.
61. Huang YH, Xiropaidis AV, Sorensen RG, Albandar JM, Hall J, Wikesjo UM. Bone formation at titanium porous oxide (TiUnite) oral implants in type IV bone. *Clin Oral Implants Res*. 2005 Feb;16(1):105-11.
62. Rocci A, Martignoni M, Gottlow J. Immediate loading of Branemark System TiUnite and machined-surface implants in the posterior mandible: a randomized open-ended clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2003;5 Suppl 1:57-63.
63. Friberg B, Jemt T. Rehabilitation of edentulous mandibles by means of five TiUnite implants after one-stage surgery: a 1-year retrospective study of 90 patients. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2008 Mar;10(1):47-54.

64. Bereznai M, Pelsoczi I, Toth Z, Turzo K, Radnai M, Bor Z, et al. Surface modifications induced by ns and sub-ps excimer laser pulses on titanium implant material. *Biomaterials*. 2003 Oct;24(23):4197-203.
65. Gaggl A, Schultes G, Muller WD, Karcher H. Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces--a comparative study. *Biomaterials*. 2000 May;21(10):1067-73.
66. Soboyejo WO, Nemetski B, Allameh S, Marcantonio N, Mercer C, Ricci J. Interactions between MC3T3-E1 cells and textured Ti6Al4V surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2002 Oct;62(1):56-72.
67. Frenkel SR, Simon J, Alexander H, Dennis M, Ricci JL. Osseointegration on metallic implant surfaces: effects of microgeometry and growth factor treatment. *J Biomed Mater Res*. 2002;63(6):706-13.
68. Li J, Liao H, Fartash B, Hermansson L, Johnsson T. Surface-dimpled commercially pure titanium implant and bone ingrowth. *Biomaterials*. 1997 May;18(9):691-6.
69. Karacs A, Fancsaly AJ, Divinyi T, Petó G, Kovách G. Morphological and animal study of titanium dental implant surface induced by blasting and high intensity pulsed Nd-glass laser. *Materials Science and Engineering: C*. 2003;23(3):431-5.
70. Hallgren C, Reimers H, Chakarov D, Gold J, Wennerberg A. An in vivo study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. *Biomaterials*. 2003 Feb;24(5):701-10.

71. 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 Apr-Jun;23(2):137-43.
72. Cho SA, Jung SK. A removal torque of the laser-treated titanium implants in rabbit tibia. *Biomaterials.* 2003 Nov;24(26):4859-63.
73. Shibli JA, Mangano C, D'Avila S, Piattelli A, Pecora GE, Mangano F, et al. Influence of direct laser fabrication implant topography on type IV bone: A histomorphometric study in humans. *J Biomed Mater Res A.* 2009 Jul 9.
74. Kasemo B. Biological surface science. *Surface Science.* 2002;500:656-77.
75. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont.* 2004 Sep-Oct;17(5):544-64.
76. Curtis A, Wilkinson C. New depths in cell behaviour: reactions of cells to nanotopography. *Biochem Soc Symp.* 1999;65:15-26.
77. Meirelles L, Currie F, Jacobsson M, Albrektsson T, Wennerberg A. The effect of chemical and nanotopographical modifications on the early stages of osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008 Jul-Aug;23(4):641-7.
78. Bigerelle M, Anselme K, Noel B, Ruderman I, Hardouin P, Iost A. Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to

increase in vitro human osteoblast response. *Biomaterials*. 2002 Apr;23(7):1563-77.

79. Zhu X, Chen J, Scheideler L, Altebaeumer T, Geis-Gerstorfer J, Kern D. Cellular reactions of osteoblasts to micron- and submicron-scale porous structures of titanium surfaces. *Cells Tissues Organs*. 2004;178(1):13-22.

80. Abron A, Hopfensperger M, Thompson J, Cooper LF. Evaluation of a predictive model for implant surface topography effects on early osseointegration in the rat tibia model. *J Prosthet Dent*. 2001 Jan;85(1):40-6.

81. Cooper LF, Zhou Y, Takebe J, Guo J, Abron A, Holmen A, et al. Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. *Biomaterials*. 2006 Feb;27(6):926-36.

82. Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A. Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004 Sep-Oct;19(5):659-66.

83. Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Sep;20 Suppl 4:185-206.

84. Wang XX, Yan W, Hayakawa S, Tsuru K, Osaka A. Apatite deposition on thermally and anodically oxidized titanium surfaces in a simulated body fluid. *Biomaterials*. 2003 Nov;24(25):4631-7.

85. Yang B, Uchida M, Kim HM, Zhang X, Kokubo T. Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment. *Biomaterials*. 2004 Mar;25(6):1003-10.
86. Wang J, de Boer J, de Groot K. Preparation and characterization of electrodeposited calcium phosphate/chitosan coating on Ti6Al4V plates. *J Dent Res*. 2004 Apr;83(4):296-301.
87. Agata De Sena L, Calixto De Andrade M, Malta Rossi A, de Almeida Soares G. Hydroxyapatite deposition by electrophoresis on titanium sheets with different surface finishing. *J Biomed Mater Res*. 2002 Apr;60(1):1-7.
88. Barrere F, Snel MM, van Blitterswijk CA, de Groot K, Layrolle P. Nano-scale study of the nucleation and growth of calcium phosphate coating on titanium implants. *Biomaterials*. 2004 Jun;25(14):2901-10.
89. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. Discrete calcium phosphate nanocrystalline deposition enhances osteoconduction on titanium-based implant surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Aug;90(2):577-85.
90. Orsini G, Piattelli M, Scarano A, Petrone G, Kenealy J, Piattelli A, et al. Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *J Periodontol*. 2007 Feb;78(2):209-18.
91. Goene RJ, Testori T, Trisi P. Influence of a nanometer-scale surface enhancement on de novo bone formation on titanium implants: a

histomorphometric study in human maxillae. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2007 Jun;27(3):211-9.

92. Bessho K, Carnes DL, Cavin R, Chen HY, Ong JL. BMP stimulation of bone response adjacent to titanium implants in vivo. *Clin Oral Implants Res*. 1999 Jun;10(3):212-8.

93. Wikesjo UM, Sorensen RG, Kinoshita A, Wozney JM. RhBMP-2/alphaBSM induces significant vertical alveolar ridge augmentation and dental implant osseointegration. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2002;4(4):174-82.

94. Wikesjo UM, Xiropaidis AV, Qahash M, Lim WH, Sorensen RG, Rohrer MD, et al. Bone formation at recombinant human bone morphogenetic protein-2-coated titanium implants in the posterior mandible (Type II bone) in dogs. *J Clin Periodontol*. 2008 Nov;35(11):985-91.

95. Boyne P, Jones SD. Demonstration of the osseoinductive effect of bone morphogenetic protein within endosseous dental implants. *Implant Dent*. 2004 Jun;13(2):180-4.

96. Huang YC, Simmons C, Kaigler D, Rice KG, Mooney DJ. Bone regeneration in a rat cranial defect with delivery of PEI-condensed plasmid DNA encoding for bone morphogenetic protein-4 (BMP-4). *Gene Ther*. 2005 Mar;12(5):418-26.

97. Meraw SJ, Reeve CM. Qualitative analysis of peripheral peri-implant bone and influence of alendronate sodium on early bone regeneration. *J Periodontol*. 1999 Oct;70(10):1228-33.
98. Meraw SJ, Reeve CM, Wollan PC. Use of alendronate in peri-implant defect regeneration. *J Periodontol*. 1999 Feb;70(2):151-8.
99. Kajiwara H, Yamaza T, Yoshinari M, Goto T, Iyama S, Atsuta I, et al. The bisphosphonate pamidronate on the surface of titanium stimulates bone formation around tibial implants in rats. *Biomaterials*. 2005 Feb;26(6):581-7.
100. Peter B, Pioletti DP, Laib S, Bujoli B, Pilet P, Janvier P, et al. Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. *Bone*. 2005 Jan;36(1):52-60.
101. Edwards BJ, Hellstein JW, Jacobsen PL, Kaltman S, Mariotti A, Migliorati CA. Updated recommendations for managing the care of patients receiving oral bisphosphonate therapy: an advisory statement from the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *J Am Dent Assoc*. 2008 Dec;139(12):1674-7.

3 PROPOSIÇÃO

O propósito do presente estudo foi caracterizar quimicamente e avaliar por meio de teste biomecânico e análise histomorfométrica, a resposta in vivo de implantes com superfície modificada por laser e superfície recoberta por hidroxiapatita biomimética em relação a implantes de superfície usinada, instalados em tíbia de coelhos após 4, 8 e 12 semanas de cicatrização.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Implantes

Esse estudo utilizou três diferentes superfícies de implantes, uma comercial, considerada controle, e as outras duas testes, sendo os implantes utilizados (3,75mm x 10mm) provenientes de uma única empresa (Titânium Fix[®], AS Technology, São José dos Campos, Brasil), tanto o comercial quanto os utilizados para modificação da superfície.

Os implantes testes tiveram as superfícies modificadas pelo Grupo de Biomateriais do Instituto de Química – UNESP – Araraquara.

Implantes avaliados:

- 1- Implante comercial de Ti cp e superfície usinada (Titanium Fix[®]) (MS) → 48 implantes
- 2- Implante de Ti cp e superfície usinada (Titanium Fix[®]), com Tratamento de Superfície por Feixe de Laser (LMS), realizado pelo Instituto de Química de Araraquara - UNESP → 48 implantes
- 3- Implante de Ti cp e superfície usinada (Titanium Fix[®]), com Tratamento de Superfície por Feixe de Laser associado à posterior deposição de Hidroxiapatita pelo método Biomimético e tratamento térmico (HA), realizado pelo Instituto de Química de Araraquara - UNESP → 48 implantes.

4.2 Desenvolvimento das Superfícies Testes:

4.2.1 Modificação da Superfície por Feixe de Laser Nd:YAG

Os implantes adquiridos (Titanium Fix – AS Technology, São José dos Campos-SP, Brasil) foram presos em um torno rotatório, sob um aparelho de laser Nd:YAG (DigiLaser – DML-100, Violino 10) (Figura 1) operando de acordo com os seguintes parâmetros: potência média de 90 a 100 mJ, comprimento de onda (λ) igual a 1064nm, frequência (ν) de pulso de 20 a 35 kHz, velocidade de varredura de 80 a 300 mm/s, espaço entre varreduras de 0,1 a 0,2 mm/s e intervalo entre pulsos de laser de 300ns.(54) Dessa forma o feixe de laser foi projetado sobre o implante, varrendo toda a superfície das espiras (Figura 2), obtendo-se assim uma superfície rugosa e homogênea (Figuras 3 a 6).



FIGURA 1

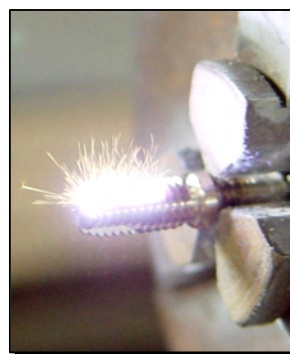


FIGURA 2



FIGURA 3

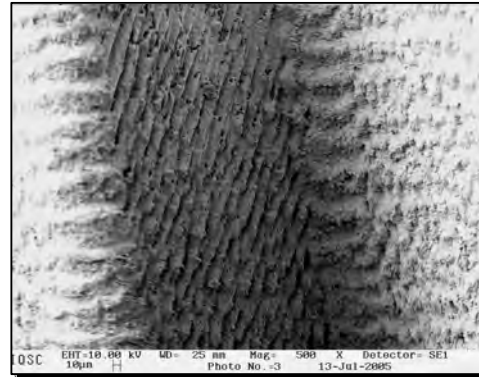


FIGURA 4

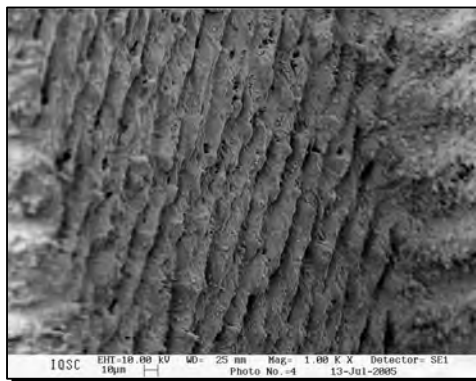


FIGURA 5

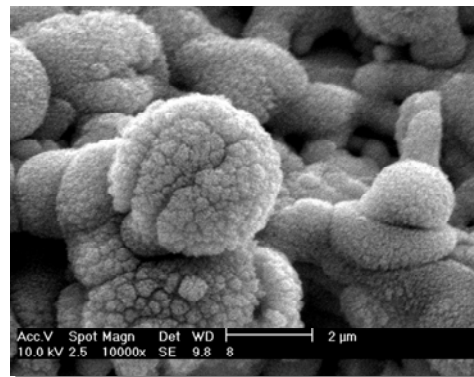


FIGURA 6

FIGURA 1- Aparelho de laser Nd:YAG (DigiLaser – DML-100, Violino 10).

FIGURA 2- Aplicação do feixe de laser sobre a superfície do implante.

FIGURA 3- Implante com superfície modificada por laser.

FIGURA 4- MEV da superfície do implante modificada por laser, aumento de 500X.

FIGURA 5- MEV da superfície do implante modificada por laser, aumento de 1.000X.

FIGURA 6- MEV da superfície do implante modificada por laser, aumento de 10.000X.

4.2.2 Recobrimento da Superfície pela Hidroxiapatita Biomimética

Para a obtenção do recobrimento por Hidroxiapatita biomimética, realizou-se previamente o tratamento da superfície do implante por feixe de laser como descrito acima, a fim de otimizar a nucleação da hidroxiapatita sobre a superfície do implante³⁴. Para o recobrimento biomimético, os implantes foram submetidos a tratamento em solução de NaOH (5,0M) por 24 horas a 60 °C; após este período, as mesmas foram secas em estufa por 3 horas a 60 °C. Após a secagem as amostras foram imersas em solução 1,5 SBF (Simulated Body Fluid) de composição iônica semelhante à do plasma sanguíneo, pH 7,25, durante 6 dias a 37 °C²⁶.

Depois de mantido o sistema durante 6 dias a 37°C formou-se sobre o substrato uma camada contínua e homogênea de até 15µm de espessura composta por cristalitos de hidroxiapatita (HA) biológica muito finos. A caracterização do recobrimento por EDS demonstrou que se tratava de uma hidroxiapatita carbonatada, CO₃-HA, de baixa cristalinidade, muito semelhante a da HA biológica presente no tecido ósseo natural. Por fim as amostras foram submetidas a tratamento térmico em forno (EDG 3P-S 1800, EDG Equipamentos) a temperatura de 800°C durante 1 hora, para a cocção da hidroxiapatita a fim de aumentar sua resistência, reduzindo sua solubilidade(Figuras 7 a 10)⁵².

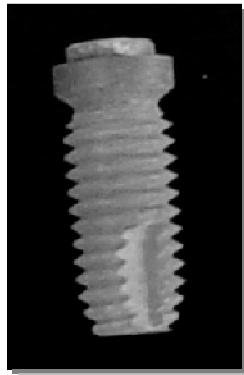


FIGURA 7

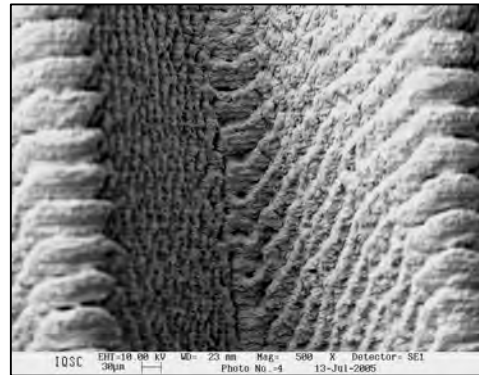


FIGURA 8

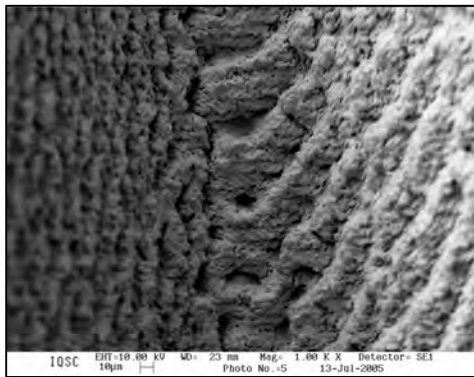


FIGURA 9

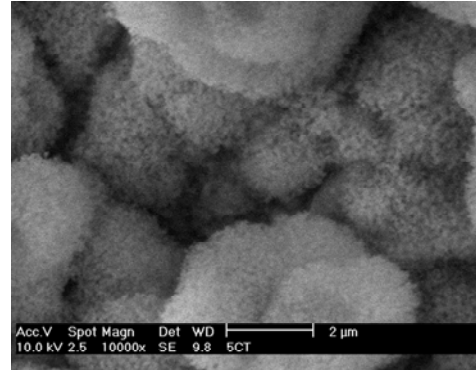


FIGURA 10

FIGURA 7- Implante com superfície recoberta por HA biomimética.

FIGURA 8- MEV da superfície do implante recoberta por HA biomimética, aumento de 500X.

FIGURA 9- MEV da superfície do implante recoberta por HA biomimética, aumento de 1.000X.

FIGURA 10- MEV da superfície do implante recoberta por HA biomimética, aumento de 10.000X.

Após realizadas as modificações das superfícies dos implantes, por feixe de laser e recobrimento por hidroxiapatita

biomimética, os implantes foram enviados para o fabricante para serem esterilizados por radiação Gama assim como os implantes comerciais de superfície usinada (Figuras 11 a 13).

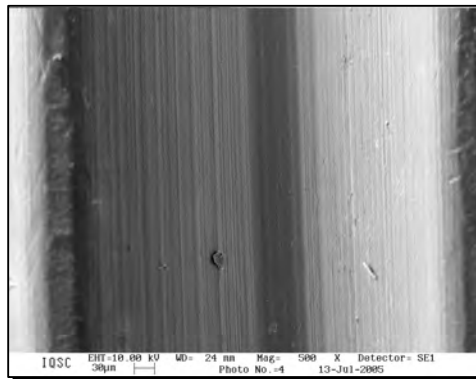


FIGURA 11

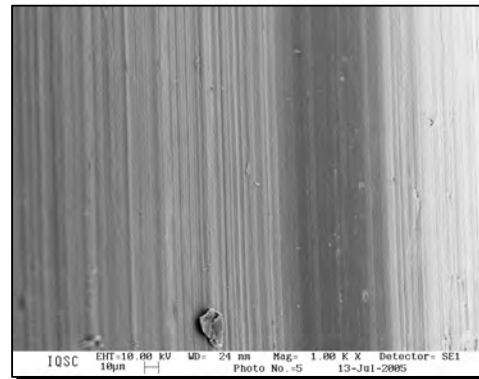


FIGURA 12

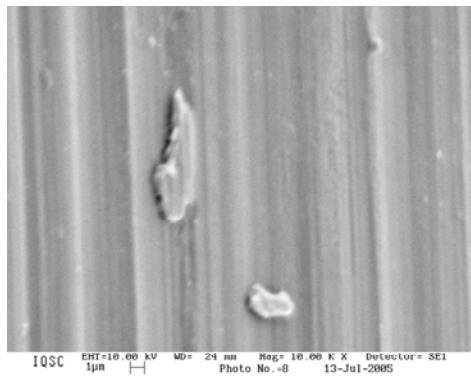


FIGURA 13

FIGURA 11- MEV da superfície do implante usinado com aumento de 500X.

FIGURA 12- MEV da superfície do implante usinado, aumento de 1.000X.

FIGURA 13- MEV da superfície do implante usinado, aumento de 10.000X.

4.3 Animais e Cuidados

Este trabalho foi inicialmente submetido e aprovado (Proc. n°02/2005) pelo Comitê de Experimentação em Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

Foram instalados 48 implantes de cada tipo, nas tíbias de 48 coelhos Nova Zelândia, com idade variando de 9 a 12 meses e pesando em média 4 Kg. Os animais foram divididos em três períodos de sacrifício, correspondentes a 4, 8 e 12 semanas. Cada período foi composto por 16 animais, sendo que cada um recebeu dois tipos diferentes de superfície, sendo, portanto, instalados 16 implantes de cada tipo por período, sendo um destinado ao teste biomecânico e o outro à análise histomorfométrica.

Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara em gaiolas individuais, com acesso *ad libitum* à água e a ração. Foi respeitado um período de 20 dias para aclimação dos animais nas instalações do biotério.

4.4 Procedimentos Cirúrgicos

4.4.1 Cirurgia de instalação dos implantes

Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de uma combinação de quetamina (Quetamina Agener®; Agener União S.A. - 0,35mg/kg) e xilazina (Dopaser® Laboratórios Calier S.A. Barcelona,

Espanha- 0.5mg/kg). Após anestesia, os animais sofreram tricotomia em ambas as pernas, anestesia local (Scandicaïne® 2%-Spécialités Sptodont, Sain – Maur, França) e por meio de uma incisão de aproximadamente 3cm as metáfises tibiais foram expostas para a instalação dos implantes (Figuras 14 a 17)⁴¹.



FIGURA 14



FIGURA 15



FIGURA 16



FIGURA 17

FIGURA 14- Localização da metáfise tibial.

FIGURA 15- Anestesia local da área a ser operada.

FIGURA 16- Realização da incisão do periósteo.

FIGURA 17- Exposição do platô ósseo para instalação do implante.

O procedimento de instalação do implante obedeceu a uma seqüência progressiva de fresas, como descrito na literatura^{20,41}, com velocidade do motor reduzida a 20 rpm (Figuras 18 a 22). A sutura do tecido muscular foi feita com fio reabsorvível (Vycril 4-0, Johnson & Johnson) e a da pele com fio de nylon (Mononylon 4-0) (Figura 23). Após a cirurgia os animais receberam uma dose única de antibiótico (Pentabiótico®, Wyeth-Whitehall Ltda, São Paulo, Brasi- 0,1ml/kg) e de analgésico Tylenol bebê® (15 mg/Kg).



FIGURA 18

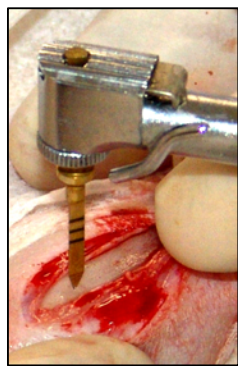


FIGURA 19

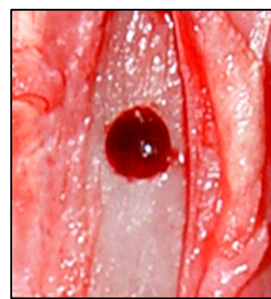


FIGURA 20

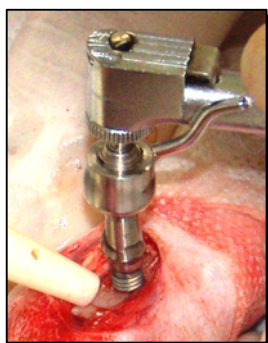


FIGURA 21

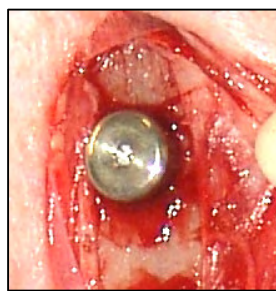


FIGURA 22



FIGURA 23

FIGURA 18- Seqüência de fresas utilizadas.

FIGURA 19- Realização de perfuração com fresa lança.

FIGURA 20- Alvéolo cirúrgico obtido após preparo com fresa 3,0.

FIGURA 21-Inserção do implante com contra-ângulo redutor (16:1) a 20rpm.

FIGURA 22- Implante inserido com plataforma ao nível ósseo.

FIGURA 23- Sutura da área cirúrgica em dois planos com fio Vicryl e Mononylon.

4.5 Ensaio Biomecânico (Artigos 1 e 2)

Após o período de osseointegração pré-estabelecido, os animais foram sacrificados com uma overdose letal de Quetamina (5 mg/kg) administrada por via intramuscular.

As áreas operadas foram reabertas e os e a plataforma dos implantes expostas e um monta-implante adaptado sobre o hexágono para que o torquímetro pudesse ser acoplado. Com o auxílio de um torquímetro analógico (15-BTG, Tohnich, Japan.), os implantes foram removidos com um movimento anti-horário até que o pico máximo de torque necessário para o rompimento da interface osso/implante fosse obtido e registrado para cada implante removido (Figuras 24 a 27).



FIGURA 24

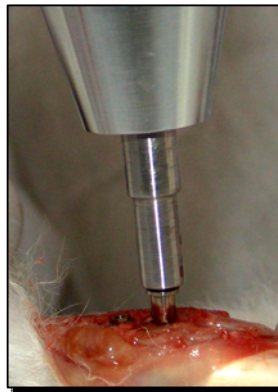


FIGURA 25



FIGURA 26

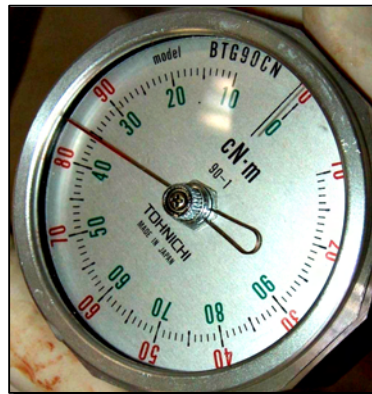


FIGURA 27

FIGURA 24- Adaptação do monta-implante sobre o implante a ser removido.

FIGURA 25- Adaptação do torquímetro sobre o implante.

FIGURA 26- Realização do torque reverso.

FIGURA 27- Verificação do valor de torque obtido.

4.6 Preparação das amostras e análise histomorfométrica (Artigo 3)

Após o sacrifício dos animais, amostras contendo os implantes e os tecidos circundantes foram retiradas, imersas em 4% formol neutro-tamponado e processadas de acordo com o método descrito por Donath & Breuner (1982)¹⁴. Os blocos foram desidratados em série crescente de etanol (60 - 100%) e, posteriormente, infiltrados e polimerizados em resina fotopolimerizável (Technovit 7200 VLC, Kultzer Heraeus GmbH & Co., Wehrheim, Alemanha). Os blocos contendo o implante e o tecido ósseo foram cortados em um ponto central usando um sistema de corte e desgaste (Exakt Apparatebau, Hamburgo, Alemanha). As seções finais que compuseram as lâminas foram de aproximadamente 45 µm de espessura e corados com azul de Stevenel associado a fuccina ácida e analisadas em um microscópio óptico (DIASTAR - Leica Reichert & Jung products, Alemanha). As avaliações Histomorfométricas foram realizadas por um pesquisador treinado e calibrado, utilizando o software (UTHSCSA ImageTool® versão 3.0 - Health Science Center - Texas University - EUA) para análise de imagem. As porcentagens de contato osso-implante (BIC) e de área óssea entre espiras (BBT) foram avaliadas separadamente para a região cortical e endosteal (Figuras 28 e 29).

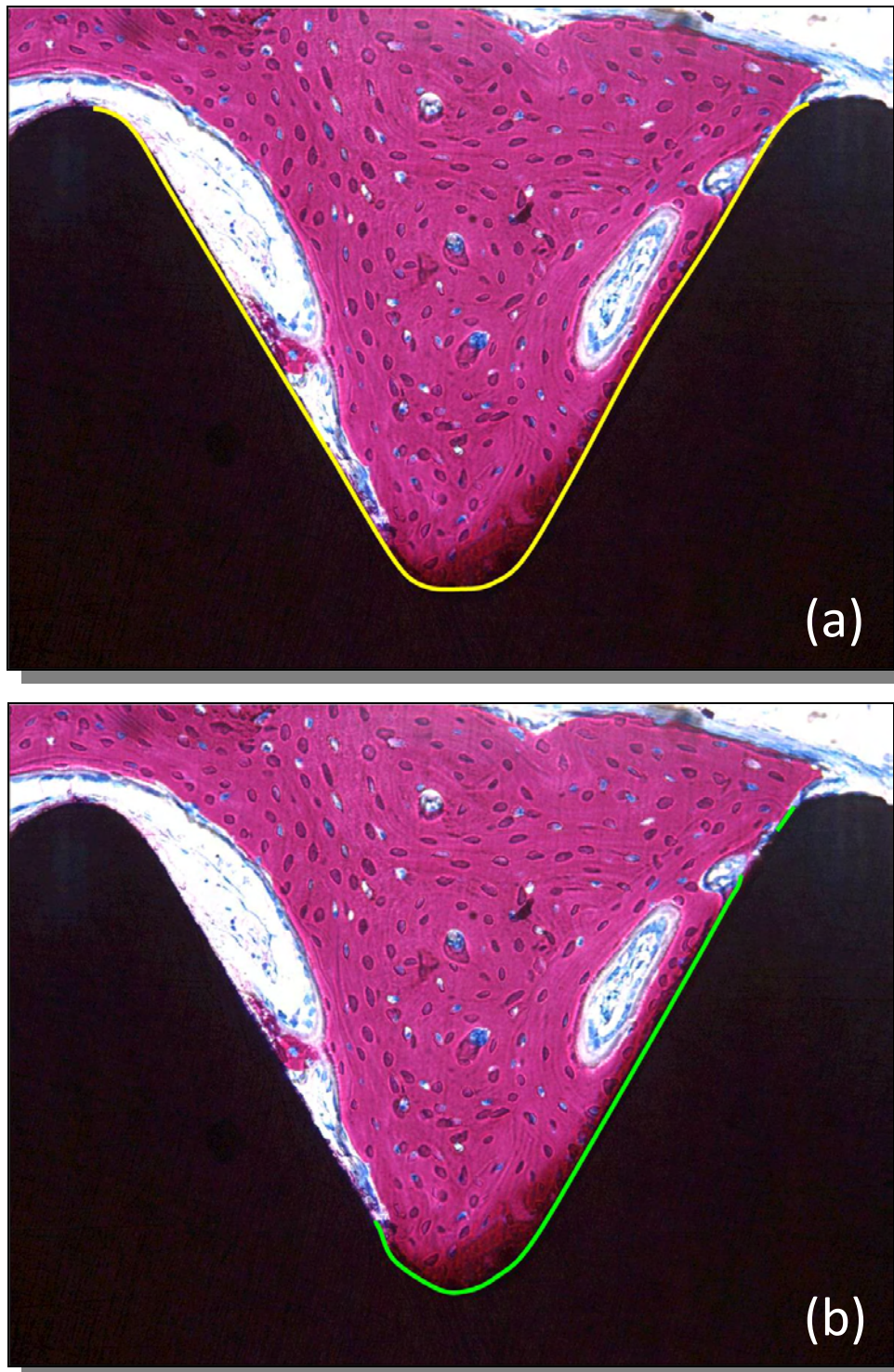


FIGURA 28- Análise do contato osso-implante (BIC%), (a) extensão linear da espira e (b) extensão do contato osso-implante.

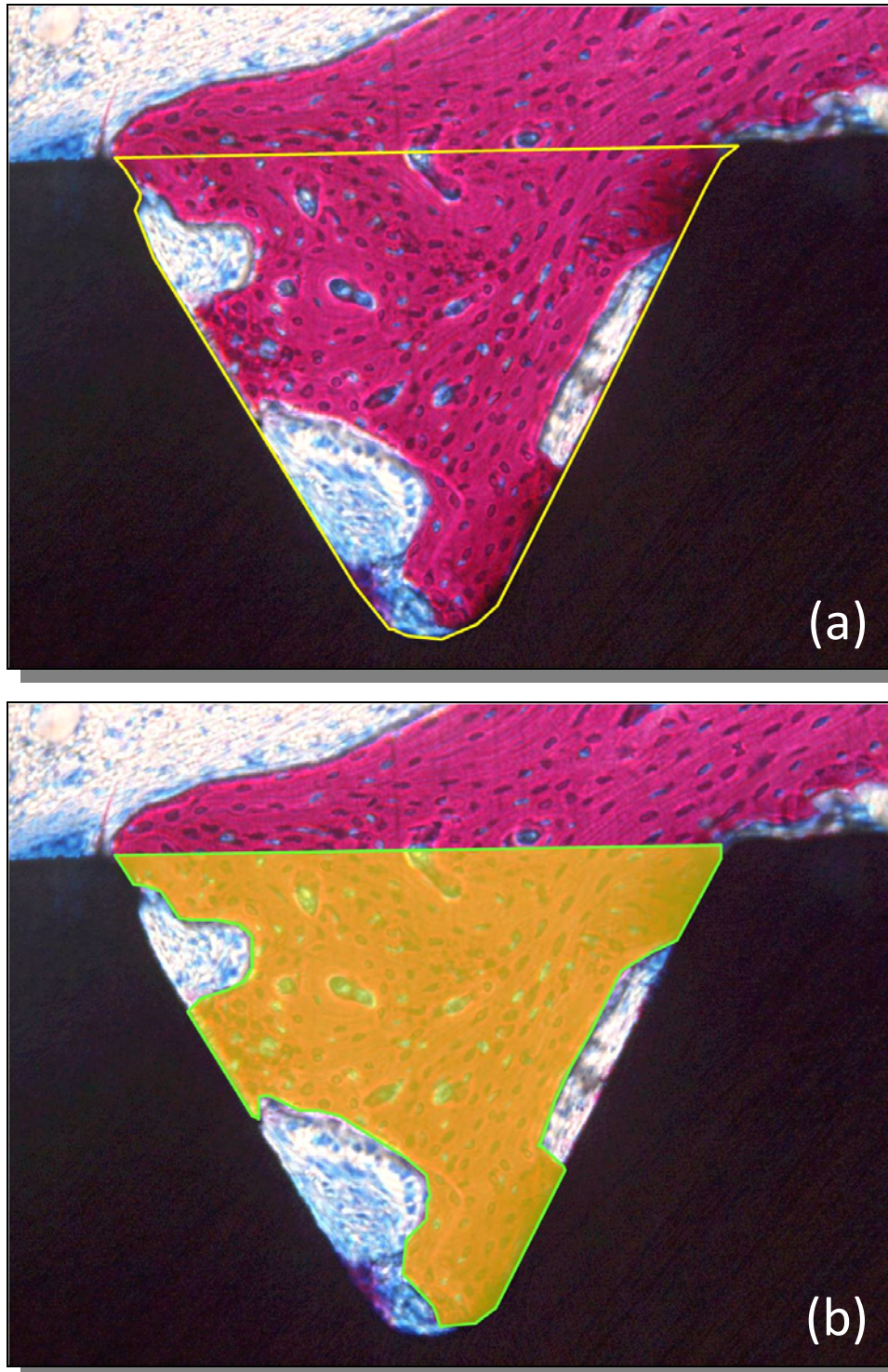


FIGURA 29- Análise da área óssea entre espiras (BBT%),(a) área total entre espiras e (b) área de tecido ósseo entre as espiras.

4.7 Análise Estatística

Artigos 1 e 3: A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do teste Bonferroni de comparações múltiplas, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $\alpha=0,05$.

Artigo 2: Por se tratarem de dados não dependentes e não-paramétricos, a análise estatística foi realizada utilizando teste de Mann Whitney, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significantes para $\alpha=0,05$.

5 RESULTADO

Os resultados desta Tese são apresentados e discutidos em três artigos descritos a seguir:

Artigo 1 - 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 Apr-Jun;23(2):137-43.

Artigo 2 - Faeda RS, Tavares HS, Sartori R, Guastaldi AC, Marcantonio E Jr.
Biological performance of chemical hydroxyapatite coating associated with implant surface modification by laser beam: biomechanical study in rabbit tibias. J Oral Maxillofac Surg. 2009 Aug;67(8):1706-15.

Artigo 3 - Faeda RS, Guastaldi AC, Marcantonio E Jr. *Laser surface modification of dental implants previously Biomimetic hydroxyapatite chemical coating. Histomorphometric study in rabbits.* (A ser submetido)

Evaluation of titanium implants with surface modification by laser beam. Biomechanical study in rabbit tibias

Rafael Silveira Faeda^(a)
Hewerson Santos Tavares^(a)
Rafael Sartori^(a)
Antonio Carlos Guastaldi^(b)
Elcio Marcantonio Jr.^(c)

^(a) Doctorate Student; ^(c) PhD, Assistant Professor – Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry of Araraquara, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

^(b) PhD Professor, Department of Biomaterials, Chemistry Institute, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

Abstract: The purpose of the present study was to evaluate, using a bio-mechanical test, the force needed to remove implants with surface modification by laser (Nd:YAG) in comparison with implants with machined surfaces. Twenty-four rabbits received one implant with each surface treatment in the tibia, machined surface (MS) and laser-modified surface (LMS). After 4, 8 and 12 weeks of healing, the removal torque was measured by a torque gauge. The surfaces studied were analyzed according to their topography, chemical composition and roughness. The average removal torque in each period was 23.28, 24.0 and 33.85 Ncm for MS, and 33.0, 39.87 and 54.57 Ncm for LMS, respectively. The difference between the surfaces in all periods of evaluation was statistically significant ($p < 0.05$). Surface characterization showed that a deep and regular topography was provided by the laser conditioning, with a great quantity of oxygen ions when compared to the MS. The surface micro-topography analysis showed a statistical difference ($p < 0.01$) between the roughness of the LMS ($R_a = 1.38 \pm 0.23 \mu\text{m}$) when compared to that of the MS ($R_a = 0.33 \pm 0.06 \mu\text{m}$). Based on these results, it was possible to conclude that the LMS implants' physical-chemical properties increased bone-implant interaction when compared to the MS implants.

Descriptors: Dental implants; Lasers; Osseointegration.

Corresponding author:

Elcio Marcantonio Junior
 Faculdade de Odontologia de Araraquara
 (UNESP) – Disciplina de Periodontia
 Rua Humaitá, 1680
 Araraquara - SP - Brazil
 CEP: 14801-093
 E-mail: elciojr@foar.unesp.br

Received for publication on Oct 29, 2007
 Accepted for publication on Apr 28, 2008

Introduction

Oral rehabilitation by means of endosseous dental implants has gained importance in clinical practice. Local bone quality and systemic implications on the oral healing condition have a direct role in the success of dental implant therapy.^{1,2}

In order to improve both quantity and quality of the bone-implant interface in face of adverse conditions, and to accelerate the osseointegration, numerous implant surface modifications have been used.³ The surface characteristics of titanium implants have been modified by additive methods, such as titanium⁴ and hydroxyapatite plasma spray,⁵ as well as by subtractive methods, such as acid etching,⁶ acid etching associated with sandblasting by either AlO₂ or TiO₂,⁷ and laser ablation.^{3,8,9}

The laser ablation technology for surfaces preparation already has numerous industrial applications. This process results in titanium surface microstructures with greatly increased hardness, corrosion resistance, a high degree of purity with a standard roughness and thicker oxide layer.^{8,10} Biological studies evaluating the role of titanium ablation topography and chemical properties showed the potential of the grooved surface to orientate osteoblast cell attachment and control the direction of ingrowth.¹¹⁻¹³

Based on the potential of this surface treatment to improve bone-implant interaction, the purpose of the present study was to evaluate the influence of laser surface modification on the retention of dental implants, when compared to that of machined implants.

Material and Methods

Implant surface preparation

Forty-eight commercially pure, titanium dental implants (Titanium Fix®, AS Technology, São José dos Campos, SP, Brazil) were used in this study. The implants were 10 mm in length and 3.75 mm in outer diameter. Twenty-four implants were left machined (as received from the manufacturer), and served as controls (machined - MS). The remaining 24 implants had their surface modified by a laser ablation process (laser modified surface - LMS).

The implants were taken directly from the sterile package, without any additional preparation prior

to laser treatment.

The laser treatment was carried out with 1,064 nm wavelength (λ) irradiation, at a pulse frequency of 20 to 35 kHz (ν), scanning speed ranging between 80 and 300 mm/s, scanning space from 0.1 to 0.2 mm/s, laser pulses interval between 300 ns, and energy from 90 to 100 mJ/pulse using a pulsed Nd:YAG laser (DigiLaser – DML-100, Violino 10; Laservall®, Sesto Calende, Valencia, Italy). After treatment, the implants were sent to the manufacturer (AS Technology, São José dos Campos, SP, Brazil) to be cleaned, sterilized and packaged.

Surface characterization

Topographic evaluation was performed under SEM (LEO 440 – Zeiss, Oberkochen, Germany) to compare the surface morphology of laser-treated *versus* machined implants. To evaluate the surfaces chemical composition, an energy dispersive analysis of X-ray spectroscopy (EDS – LEO 440, Zeiss, Oberkochen, Germany) was used.

The average roughness R_a (the arithmetic mean of the sampling area roughness, measured in μm) of each surface was analyzed using a digital profilometer (Mitutoyo SJ-301, Mitutoyo Sul Americana Ltda., Suzano, SP, Brazil).

Animal selection

Twenty-four New Zealand white rabbits, 9 to 12 months old (3,500 to 4,500 g), were used in the study. The animals were kept in individual cages, fed with a standard laboratory diet, and given tap water *ad libitum*. The experiment was approved by the Animal Experimentation Committee, School of Dentistry of Araraquara, Araraquara, SP, Brazil.

Experimental design

A total of 48 implants (3.75 x 10 mm), 24 of each kind of surface treatment, were placed in the rabbit tibias (24 animals), and evaluated after 4, 8 and 12 weeks of healing.

Surgical procedures

The animals were anesthetized through intramuscular injection of a combination of ketamine (Ketamina Agener®; Agener União Ltda., São Pau-

lo, SP, Brazil) (0.35 mg/kg of body weight) and xylazine (Rompum® Bayer S.A. São Paulo, SP, Brazil) (0.5 mg/kg of body weight). The region of the tibial metaphysis was cleaned with iodine surgical soap. Incisions of approximately 3 cm in length were performed bilaterally on the internal side of the hind leg, just below the knee. After dissection, the bone surface of the tibial metaphysis was exposed. Bicortical implant beds were prepared using a progressive sequence of spiral drills under saline cooling. One implant (10 mm in length and 3.75 mm in diameter) of each kind of surface treatment was placed in each tibia near the knee joint. The soft tissues were sutured in separate layers and the animals received postoperatively a single intramuscular dose of antibiotic (Pentabiotico Pequeno Porte – Fort Dodge®, Campinas, SP, Brazil) (0.1 ml/kg of body weight).

Removal torque test

The animals were killed according to the experimental periods (4, 8 and 12 weeks) with an intramuscular lethal dose of 30% chloral hydrate (2 ml/kg). After implant exposure, a specially designed key was connected to both the implant and the manual torque gauge manometer (15-BTG, Tohnichi, Tokyo, Japan). An anti-clockwise movement was performed to remove the implant. The maximal torque value for breakage of bone-implant interaction was measured in Newton centimeters (N cm). No forces were applied in the vertical direction so as to avoid alterations in the data.

Statistical analysis

The values of the removal torque were parametric (tested by the Shapiro-Wilk test), and the analysis of the differences between the groups and the different experimental periods in the same group were tested by the ANOVA test, followed by the Bonferroni multiple comparison test ($p < 0.05$). The roughness analysis was evaluated by the *t*-test.

Results

Topographic (SEM) and chemical (EDS) evaluation

Scanning electron micrographs of the laser-treated and machined surfaces demonstrated micro-

scopic differences in the surface topography. SEM surfaces are seen in Figures 1-4. Laser etching created a deep and regular morphological pattern with small pores, while the machined treatment created the typical microscopically grooved and relatively smooth surface characteristic.

The surface micro-topography analysis showed a statistical difference ($p < 0.01$) between the roughness of the LMS ($R_a = 1.38 \pm 0.23 \mu\text{m}$) and that of the MS ($R_a = 0.33 \pm 0.06 \mu\text{m}$).

The EDS analysis showed no contamination on the machined implants, whereas the same condition was observed on the laser-treated implants; on the latter, the presence of a great amount of oxygen on the surface from the melting and fast cooling process that occurs after surface irradiation was also detected (Graphs 1-2).

Removal torque measurements

In general, the animals presented no disturbances in soft tissue healing or tibia fractures. The torque measurement yielded statistically significant differences between the machined and the laser-etched group ($p < 0.05$) in all periods of evaluation. The mean and standard deviation of removal torque by group and time period of evaluation are summarized in Table 1.

The highest removal torque corresponded to the laser modified implants, while the lowest was demonstrated by the machined implants (Graph 3).

Discussion

The resistance of implants to removal torque has been correlated with the degree of bone in contact with the implant by several studies,¹⁴⁻¹⁶ which associated the changes in the biomechanical characteristics of the interface to the dynamics of bone healing and remodeling process.¹⁷⁻²⁰ Although an histological analysis, as the “gold-standard” evaluation procedure for osseointegration, allows visualization of the bone-implant interface, undecalcified histology is able to provide just few sections of each specimen, usually no more than two, to be representative of the implant. Furthermore, an analysis by removal torque, even though in an indirect way, allows a three-dimensional evaluation of the bone-implant

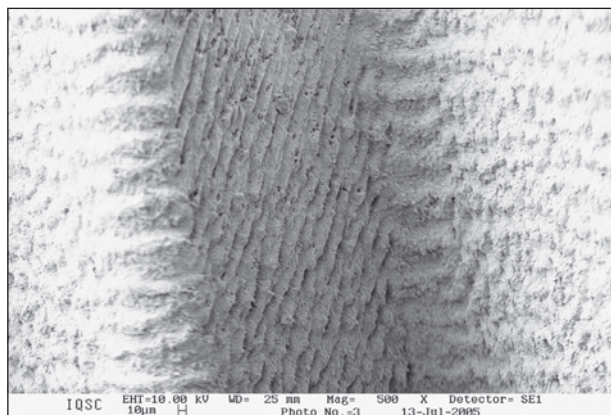


Figure 1 - SEM micrographs of the implants after laser treatment, with original magnification of 500 X.

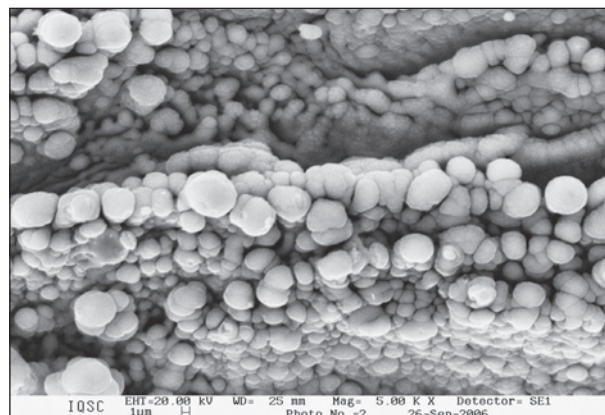


Figure 2 - SEM micrographs of the implants after laser treatment, with original magnification of 5,000 X.

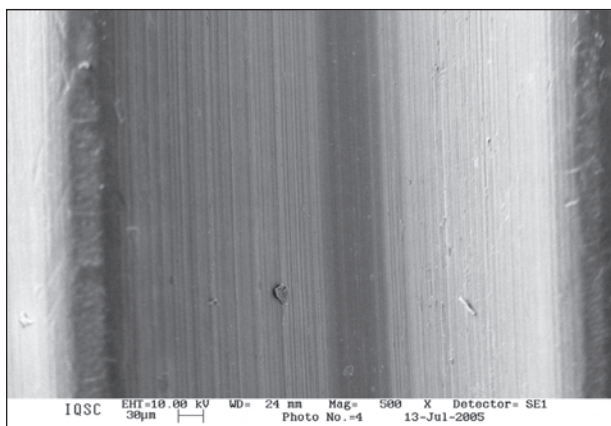


Figure 3 - SEM micrographs of the implants with machined surface, original magnification of 500 X.

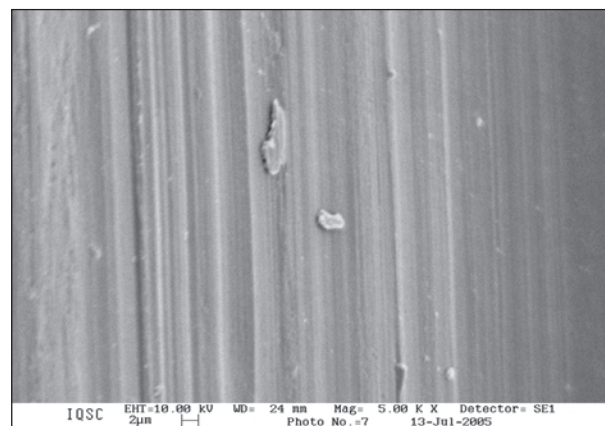
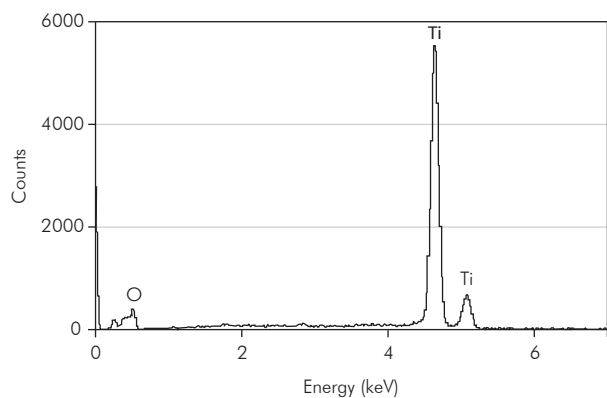
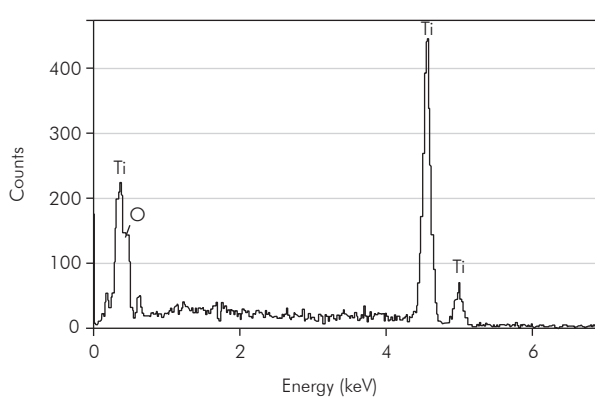


Figure 4 - SEM micrographs of the implants with machined surface, original magnification of 5,000 X.



Graph 1 - EDS analysis of a machined surface with predominantly Ti peaks.



Graph 2 - EDS analysis of a laser-treated implant showing a clean surface with Ti and O peaks.

Table 1 - Mean and Standard Deviation (SD) of removal torque (Ncm) by group and time period.

Periods (Weeks)	Surfaces Evaluated		
	MS	LMS	P value
4	23.28 ± 4.46	33.0 ± 5.8	< 0.05*
8	24.0 ± 6.34	39.87 ± 9.58	< 0.05*
12	33.85 ± 6.28	54.57 ± 17.73	< 0.05*

*significant difference at $P < 0.05$, ANOVA - Bonferroni test.

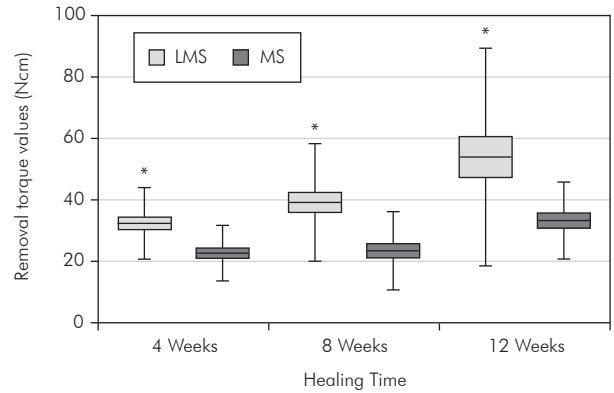
interface in the whole implant perimeter, and is considered in the literature as an important tool for the evaluation of the osseointegration process.²⁰⁻²⁴

The present study showed that the laser-treated group achieved higher removal torque values when compared to the machined control group. Moreover, the results suggest that the machined implants had a time-dependant anchorage, while the laser-treated implants had an acceleration of this process. Thus, it is possible that the stronger bone integration with laser grooved surfaces observed in the current study is not only due to a rougher surface, but may also be due to a more favorable surface chemistry than that of the machined surface.

Through the SEM analysis, it could be observed that the titanium laser ablation resulted in a very complex surface morphology, enlarging the bone-implant contact interface. The EDS showed that the laser ablation kept the surface purity with a great amount of oxygen, probably due to an increase in the thickness of the surface oxide layer, as already reported,^{10,25} favoring bone integration.

The implant surface properties have a direct role in osteogenesis at the bone-implant interface, influencing a series of coordinated events, including protein adsorption, cell proliferation, and bone tissue deposition.²⁶⁻²⁸

Some *in-vivo* and *in-vitro* experiments evaluated the biological comportment of laser modified implants. Soboyejo *et al.*¹³ (2002) evaluating the cellular response of laser grooved titanium substrates observed that this surface orientated bone cells attachment and inhibited fibroblast growth and migration. Frenkel *et al.*¹² (2002) analyzed the effect of laser grooves in a chamber simulating an intramedullary bone response around joint implants and



Graph 3 - Distribution of removal torque values (Ncm) for MS and LMS according to the experimental periods (weeks). *significant difference at $P < 0.05$, ANOVA - Bonferroni test.

concluded that this surface treatment may induce rapid ingrowth and a strong bone-implant interface, contributing to implant longevity. The same was observed by Li *et al.*²⁹ (1997) by means of an histologic evaluation and a push-out test. They observed that the bone formation into the grooves increased the retention of the implants.

The removal torque values obtained in this study are consistent with the results from previous studies, which have shown a significant increase in bone retention of implants with laser surface modification. Karacs *et al.*³⁰ (2003) compared the removal torque of implants with machined, sand-blasted and sand-blasted associated to laser ablation surfaces. They observed that the laser treatment after sand-blasting increased removal torque by almost 50%.

Hallgren *et al.*⁹ (2003), using a Nd:YAG laser, found a bone-implant contact percentage of 40% for the laser-modified implants and 32% for the machined ones. The removal torque test showed a mean value of 52 Ncm for the laser-treated implants and 35 Ncm for the machined implants after 12 weeks of healing. These values were similar to those observed in the present study (54.57 Ncm and 33.85 Ncm, respectively), using the same kind of laser. Similar comportment was found by Cho, Jung³ (2003). They compared, by the removal torque test, the implants with machined and laser-modified surfaces after 8 weeks of implantation. The removal torque value was 23.58 ± 3.71 Ncm for the machined implants and 62.57 ± 10.44 Ncm for the la-

ser-modified implants.

As observed and described by different studies, laser treatment seems to be a promising method for dental implant surface modification, producing a surface pattern with important properties for osseointegration, thus improving bone-implant retention, and resulting in a better and faster integration when compared to controls.

Conclusion

Within the limitations of the present study, the results show that the implants with surfaces modi-

fied by laser ablation produced a significant enhancement in removal torque when compared to the implants with machined surfaces. Further studies are required to evaluate the behavior of these implant surfaces in terms of osseointegration with a histomorphometric analysis.

Acknowledgments

The authors greatly appreciated the assistance of AS Technology and Aditek-Brazil for the technical support.

References

- Orsini G, Piattelli M, Scarano A, Petrone G, Kenealy J, Piattelli A *et al.* Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *J Periodontol.* 2007 Feb;78(2):209-18.
- Sakakura CE, Margonar R, Holzhausen M, Nociti Jr FH, Alba Jr RC, Marcantonio Jr E. Influence of cyclosporin-a therapy on bone healing around titanium implants. A histometric and biomechanic study in rabbits. *J Periodontol.* 2003 Jul;74(7):976-81.
- Cho SA, Jung SK. A removal torque of the laser-treated titanium implants in rabbit tibia. *Biomaterials.* 2003 Nov;24(26):4859-63.
- 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 Jun;12(3):196-201.
- Torensma R, Ter Brugge PJ, Jansen JA, Figdor CG. Ceramic hydroxyapatite coating on titanium implants drives selective bone marrow stromal cell adhesion. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Oct;14(5):569-77.
- Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, Rao W, Testori T, Porter S. Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. *J Periodontol.* 2003;74(7):945-56.
- Buser D, Mericske-Stern R, Bernard JP, Behneke A, Behneke N, Hirt HP *et al.* Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part I. 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clin Oral Implants Res.* 1997 Jun;8(3):161-72.
- Gaggl A, Schultes G, Muller WD, Karcher H. Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces - a comparative study. *Biomaterials.* 2000 May;21(10):1067-73.
- Hallgren C, Reimers H, Chakarov D, Gold J, Wennerberg A. An *in vivo* study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. *Biomaterials.* 2003 Feb;24(5):701-10.
- Bereznai M, Pelsoczi I, Toth Z, Turzo K, Radnai M, Bor Z *et al.* Surface modifications induced by ns and sub-ps excimer laser pulses on titanium implant material. *Biomaterials.* 2003 Oct;24(23):4197-203.
- Cooper LF. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent.* 2000 Nov;84(5):522-34.
- Frenkel SR, Simon J, Alexander H, Dennis M, Ricci JL. Osseointegration on metallic implant surfaces: effects of microgeometry and growth factor treatment. *J Biomed Mater Res.* 2002;63(6):706-13.
- Soboyejo WO, Nemetski B, Allameh S, Marcantonio N, Mercer C, Ricci J. Interactions between MC3T3-E1 cells and textured Ti6Al4V surfaces. *J Biomed Mater Res.* 2002 Oct;62(1):56-72.
- Gotfredsen K, Nimb L, Hjörting-Hansen E, Jensen JS, Holmén A. Histomorphometric and removal torque analysis for TiO₂-blasted titanium implants. An experimental study on dogs. *Clin Oral Implants Res.* 1992 Jun;3(2):77-84.
- Klokkevold PR, Nishimura RD, Adachi M, Caputo A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res.* 1997 Dec;8(6):442-7.
- Wennerberg A, Ektessabi A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B. A 1-year follow-up of implants of differing surface roughness placed in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997 Jul-Aug;12(4):486-94.
- Carlsson L, Rostlund T, Albrektsson B, Albrektsson T. Removal torques for polished and rough titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1988 Spring;3(1):21-4.
- Cordioli G, Majzoub Z, Piattelli A, Scarano A. Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: an experimental study in the rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000 Sep-Oct;15(5):668-74.

19. Ferguson SJ, Brogini N, Wieland M, de Wild M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J *et al.* Biomechanical evaluation of the interfacial strength of a chemically modified sandblasted and acid-etched titanium surface. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Aug;78(2):291-7.
20. Johansson C, Albrektsson T. Integration of screw implants in the rabbit: a 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1987 Spring;2(2):69-75.
21. Baker D, London RM, O'Neal R. Rate of pull-out strength gain of dual-etched titanium implants: a comparative study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999 Sep-Oct;14(5):722-8.
22. Favero LG, Pisoni A, Paganelli C. Removal torque of osseointegrated mini-implants: an *in vivo* evaluation. *Eur J Orthod*. 2007 Oct;29(5):443-8.
23. Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M, Pepato MT, Alba RC, Marcantonio Jr E. The influence of diabetes *mellitus* and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. *Implant Dent*. 2003;12(4):333-9.
24. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implants Res*. 1995 Mar;6(1):24-30.
25. Pérez del Pino A, Serra P, Morenza JL. Oxidation of titanium Through Nd:YAG laser irradiation. *Appl Surf Sci*. 2002;197(198):887-90.
26. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*. 1998 Sep-Oct;11(5):391-401.
27. Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Keller J, Stanford C. Differentiation of preosteoblasts is affected by implant surface microtopographies. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Jun;69(3):462-8.
28. Shibli JA, Grassi S, De Figueiredo LC, Feres M, Marcantonio Jr E, Iezzi G *et al.* Influence of implant surface topography on early osseointegration: a histological study in human jaws. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007 Feb;80(2):377-85.
29. Li J, Liao H, Fartash B, Hermansson L, Johnsson T. Surface-dimpled commercially pure titanium implant and bone ingrowth. *Biomaterials* 1997. May;18(9):691-6.
30. Karacs A, Fancsaly AJ, Divinyi T, Petó G, Kovách G. Morphological and animal study of titanium dental implant surface induced by blasting and high intensity pulsed Nd-glass laser. *Mat Sci Eng C*. 2003;23(3):431-5.

Biological Performance of Chemical Hydroxyapatite Coating Associated With Implant Surface Modification by Laser Beam: Biomechanical Study in Rabbit Tibias

Rafael S. Faeda, DDS, MS,* Hewerson S. Tavares, DDS, MS,†
Rafael Sartori, DDS, MS,‡ Antonio C. Guastaldi, MS, PhD,§ and
Elcio Marcantonio Jr, DDS, PhD, MS||

Purpose: Considering the potential of the association between laser ablation and smaller scale hydroxyapatite (HA) coatings to create a stable and bioactive surface on titanium dental implants, the aim of the present study was to determine, by the removal torque test, the effects of a surface treatment created by laser-ablation (Nd:YAG) and, later, thin deposition of HA particles by a chemical process, compared to implants with only laser-ablation and implants with machined surfaces.

Materials and Methods: Forty-eight rabbits received 1 implant by tibia of the following surfaces: machined surface (MS), laser-modified surface (LMS), and biomimetic hydroxyapatite coated surface (HA). After 4, 8, and 12 weeks of healing, the removal torque was measured by a torque gauge. The surfaces studied were analyzed according to their topography, chemical composition, and roughness.

Results: Average removal torque in each period was 23.28, 24.0, and 33.85 Ncm to MS, 33.0, 39.87, and 54.57 Ncm to LMS, and 55.42, 63.71 and 64.0 Ncm to HA. The difference was statistically significant ($P < .05$) between the LMS-MS and HA-MS surfaces in all periods of evaluation, and between LMS-HA to 4 and 8 weeks of healing. The surface characterization showed a deep, rough, and regular topography provided by the laser conditioning, that was followed by the HA coating.

Conclusions: Based on these results, it was possible to conclude that the implants with laser surface modification associated with HA biomimetic coating can shorten the implant healing period by the increase of bone implant interaction during the first 2 months after implant placement.

© 2009 American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons

J Oral Maxillofac Surg 67:1706-1715, 2009

Longitudinal and histological data indicate that the success rates for endosseous implants vary according to bone quality and systemic conditions.¹

To improve quantity and quality of the bone-implant interface under these adverse conditions and to decrease treatment time frames by decreasing the healing period for osseointegration establishment, numerous implant surface modifications have been used.^{2,3}

The implant surface is the first part of the implant that interacts with the host. Significant attention has been

paid toward increasing the biocompatibility and osteoconductivity of implant surfaces. Surface texture and chemistry modification methods (titanium^{4,5} and hydroxyapatite [HA] plasma spray,^{6,7} acid etching,^{2,8} acid etching associated with sandblasting by aluminum dioxide or titanium dioxide [TiO₂],^{9,10} and laser ablation^{3,11,12}) have been successful in increasing the host response and consequently bone-to-implant contact and bone mechanical properties at early implantation times.^{13,14}

Received from UNESP, São Paulo State University, Araraquara, São Paulo, Brazil.

*PhD Candidate, Department of Periodontology, School of Dentistry.

†PhD Candidate, Department of Biomaterials, Chemistry Institute.

‡PhD Candidate, Department of Periodontology, School of Dentistry.

§Professor, Department of Biomaterials, Chemistry Institute.

||Professor, Department of Periodontology, School of Dentistry.

Address correspondence and reprint requests to Dr Faeda: Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Disciplina de Periodontia, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brazil; e-mail: rafaelsfaeda@foar.unesp.br

© 2009 American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons
0278-2391/09/6708-0021\$36.00/0

doi:10.1016/j.joms.2009.03.046

Many studies have described that increasing implant surface roughness positively influences the host response to endosseous implants.^{13,14} Therefore, the most recent studies designed to improve the host response to endosseous implants have added surface chemistry changes to rough surfaces.^{1,15} Many investigators have correlated the fast osseointegration of the apatite-coated implants to the ability of calcium phosphate coatings to adsorb proteins. It has been observed that proteins would initially be adsorbed from the bodily fluid onto the surface and thus influence subsequent cellular functions (such as cell proliferation, deposition of calcium-containing mineral deposits, etc). The binding of fibrinogen, for example, would lead to increased fibrin binding to the implant surface resulting in an earlier establishment of the 3-dimensional matrix through which osteogenic cells have to migrate to reach the implant surface.¹⁶⁻¹⁸

Surface chemistry modifications by the incorporation of calcium (Ca) and phosphorus (P) ions onto the implant through various manufacturing processes (ion sputtering, plasma spray, sol gel, electrolysis, and biomimetic methods) have been investigated in recent decades.¹⁹⁻²¹ These studies have shown that HA-coated implants present higher degrees of osteoconductivity, attaining higher degrees of fixation at earlier

osseointegration times compared with uncoated implants, with plasma-sprayed HA being the most commercially available bioactive coating.^{19,22-25}

Although the integration of plasma-sprayed HA-coated implants occurs faster than uncoated implants, studies have shown that these coatings may be partially dissolved/resorbed after long periods of function.²²⁻²⁵ In addition, the plasma-sprayed technique does not allow accurate control of the chemical composition and crystallographic structure of the coating, being mechanically and chemically unstable and bonding weakly to the substrate.¹⁹⁻²² This interface between titanium oxide (TiO) and the apatite coating has been regarded as a weak link, where adhesive failures have been reported to occur during implant placement and function.^{26,27}

In an attempt to benefit from the increased osteoconduction observed in Ca- and P-based coatings, smaller-scale apatite coatings have been developed for implant surfaces through various processing techniques.^{1,19,28} These smaller-scale bioceramic surface modifications are often applied in much thinner coatings (a few micrometers) compared with plasma-sprayed HA coatings.^{1,15,19,28}

The main advantages associated with HA chemical deposition on the surface include controlled composi-

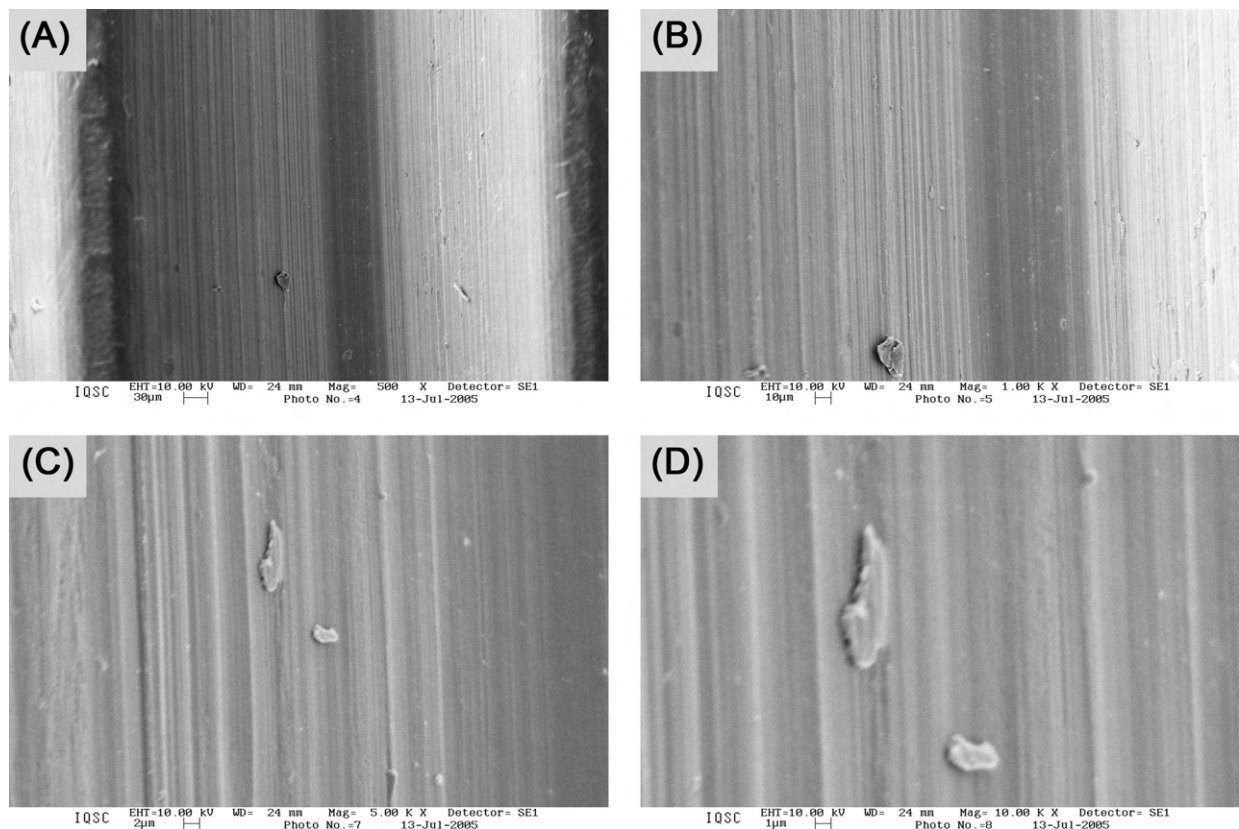


FIGURE 1. SEM micrographs of implants with machined surface; original magnifications A, $\times 500$, B, $\times 1,000$, C, $\times 5,000$, and D, $\times 10,000$.

Faeda et al. Hydroxyapatite and Implant Surface Modification. *J Oral Maxillofac Surg* 2009.

tion and thickness, enhanced adhesion to the metallic substrate, and surface topography known to increase the host-to-implant response at early osseointegration times.^{1,15,19,26,28} Therefore, the possibility of having a close and stable bone-implant contact mediated by the apatite layer may be an advantage presented by bio-ceramic thin films compared with thicker plasma-sprayed HA coatings.²⁶

The strong bone-implant bonding, mediated by the HA layer, requires a reliable chemical link between the coating and the Ti implant surface. The TiO₂ layer formed on the Ti commercially pure (cp) implant surface has the ability to improve the bonding strength due to the high chemical affinity of TiO₂ with respect to HA and Ti.²⁹ A method used to increase the thickness of the TiO layer is laser ablation. The laser beam increases the titanium surface temperature to the melting point followed by a fast cooling that results in unique microstructures with greatly increased hardness and corrosion resistance, a high degree of purity, standard roughness, and a thick TiO layer.^{3,11,12}

When TiO₂ is exposed to body fluids, it loses protons and negative TiO groups are formed. These negative sites attract Ca²⁺ ions from the body fluid that

bond to the surface.³⁰ A layer of Ca²⁺ ions becomes slightly positively charged and attracts negatively charged P ions, which bond to the surface, and a metastable phase of CaP is formed.³¹ This biochemical process allows a stable HA coating layer strongly bonded to the Ti implant surface to be obtained.

Considering the potential of the association between laser ablation and HA thin-layer coatings to create a nice bioactive environment on Ti dental implants, the aim of the present study was to determine, by the removal torque test, the effects of a surface treatment created by laser ablation and then with a thin deposition of HA particles by a chemical process and then compare them with the implants with only laser ablation and implants with machined surfaces.

Materials and Methods

IMPLANT SURFACE PREPARATION

Seventy-two commercially pure, Ti dental implants (Titanium Fix, AS Technology, San Jose dos Campos, São Paulo, Brazil) were used in this study. The implants were 10 mm long and 3.75 mm in outer dia-

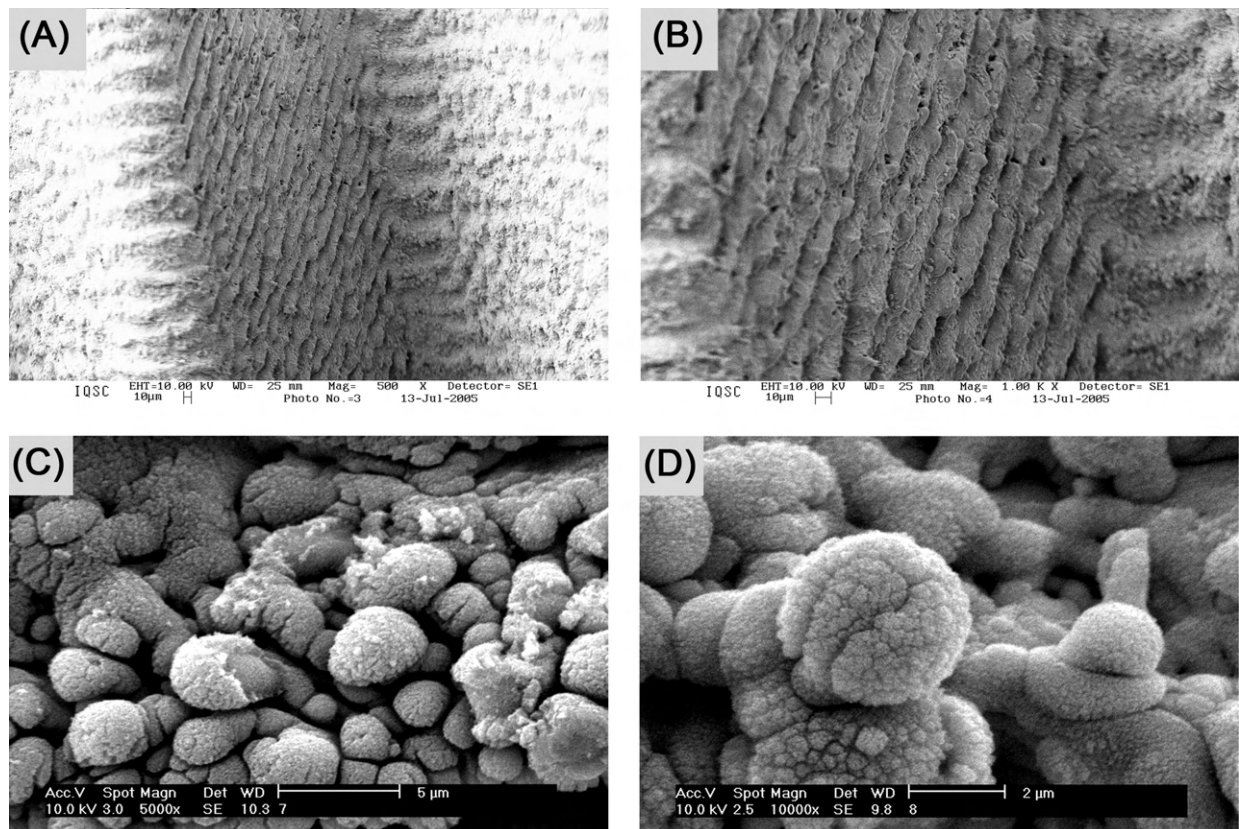


FIGURE 2. SEM micrographs of implants after laser treatment; original magnifications A, $\times 500$, B, $\times 1,000$, C, $\times 5,000$, and D, $\times 10,000$.

meter. Twenty-four implants were left machined (as received from the manufacturer) as controls (machined surface [MS]), and the remaining 48 implants had the surface modified by a laser ablation process (laser-modified surface [LMS]).

Laser Surface Modification

The implants were taken directly from the sterile package, without any additional preparation before laser treatment. The laser treatment was carried out at a 1,064-nm wavelength (λ) irradiation, pulse frequency of 20 to 35 kHz (ν), scanning speed of 80 to 300 mm/s, scanning space of 0.1 to 0.2 mm/s, laser pulse interval of 300 ns, and energy of 90 to 100 mJ/pulse using a pulsed Nd:YAG laser (DigiLaser, DML-100, Violino 10; Laservall, Sesto Calende, Valencia, Italy).³²

Chemical HA Coating

To coat the implants with HA, the implants were previously prepared by laser ablation, as described above, to create a complex surface morphology and optimize the HA nucleation on the implant surface.^{30,31,33} Then, to the chemical coating, the implants were subjected to a treatment of 5 mol/L NaOH solution at 60°C for 24 hours and to a subsequent heat treatment at 600°C for 1 hour. After this, the samples were immersed in a sodium silicate solution for 24

hours at 37°C. Subsequently, the implants were treated with a simulated body fluid (SBF) solution for 24 hours at 37°C, for the slow and organized nucleation of apatite on the implant surface. After this, the implants were immersed for 6 days at 37°C in a solution 1.5 M SBF for the growth of HA. The SBF solution was refreshed every 24 hours. After the implant coating, implants were heat treated at 800°C at a heating rate of 5°C/min per hour, being subsequently slowly cooled inside the oven.³⁴

After treatments, the implants were sent to the manufacturer (AS Technology) to be cleaned, sterilized, and packaged.

SURFACE CHARACTERIZATION

Topographic evaluation was performed under scanning electron microscopy (LEO 440) to compare the surface morphology of laser-treated, chemical HA coating and machined implants. To evaluate the surface chemical composition, an energy dispersive analysis of x-ray spectroscopy (EDS; LEO 440) was used.

Average roughness R_a (arithmetic mean of sampling area roughness, measured in micrometers) of each surface was analyzed using a digital profilometer (Mitutoyo SJ-301).

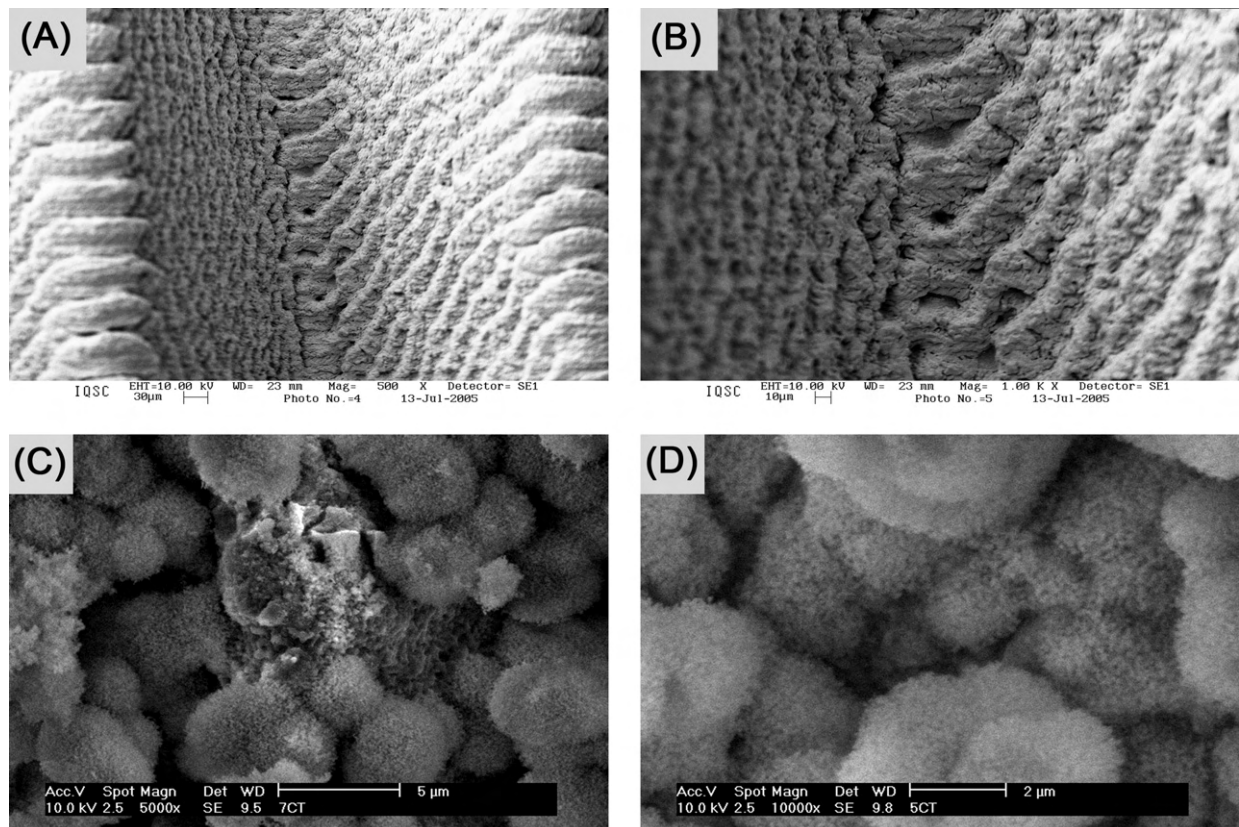


FIGURE 3. SEM micrographs of implants with HA coating; original magnifications A, $\times 500$, B, $\times 1,000$, C, $\times 5,000$, and D, $\times 10,000$.

ANIMAL SELECTION

Forty-eight New Zealand white rabbits, 9 to 12 months old (3,500 to 4,500 g), were used in the study. The animals were kept in individual cages, fed a standard laboratory diet, and given tap water ad libitum. The experiment was approved by the animal experimentation committee of Araraquara Dental School, São Paulo.

EXPERIMENTAL DESIGN

Seventy-two implants (3.75×10 mm), 24 on each surface, were placed in the rabbit tibias (48 animals) and evaluated after 4, 8, and 12 weeks of healing.

SURGICAL PROCEDURES

The animals were anesthetized through intramuscular injection of a combination of ketamine (0.35 mg/kg of body weight) and xylazine (0.5 mg/kg of body weight). The region of the tibial metaphysis was cleaned with iodine surgical soap. Incisions approximately 3 cm in length were performed bilaterally at the internal side of the hind leg, just below the knee. After dissection, the bone surface of the tibial metaphysis was exposed. Bicortical implant beds were prepared using a progressive sequence of spiral drills under saline cooling. One implant (10 mm in length and 3.75 mm in diameter) of each surface was placed in each tibia near the knee joint. Soft tissues were sutured in separate layers and the animals postoperatively received a single intramuscular dose of antibiotic (0.1 mL/kg of body weight).

REMOVAL TORQUE TEST

Animals were killed according to the experimental periods (4, 8, and 12 weeks) with an intramuscular lethal dose of 30% chloral hydrate (2 mL/kg). After implant exposure, a specially designed key was connected to the implant and the manual torque gauge manometer (15-BTG, Tohnichi, Japan). An anticlockwise movement was performed to remove the implant. The maximal torque value for breakage of bone-implant interaction was measured in Newton centimeters. No forces were applied in the vertical direction to avoid alterations in the data.

SURFACE ANALYSIS OF TORQUED IMPLANTS

After the removal torque test, the implants corresponding to the 8-week period were completely removed from the tibias, cleaned in 4% neutral-buffered formaldehyde solution for 10 minutes, dehydrated using ascending series of alcohols, and dried. The implant surfaces were observed by scanning electron microscopy for failure analysis.

STATISTICAL ANALYSIS

Analysis of the removal torque among groups and different experimental periods in the same group were

tested by nonparametric Mann-Whitney U test ($P < .05$), and roughness analysis was evaluated by t test.

Results

TOPOGRAPHIC (SEM) AND CHEMICAL (EDS) EVALUATIONS

Scanning electron microscopy of the laser-treated, chemical HA-coated, and machined surfaces demonstrated microscopic differences on the surface topography. Scanning electron microscopic (SEM) surfaces are shown in Figures 1 to 3. Laser etching created a deep and regular morphologic pattern with small pores. The HA coating was deposited on the surface following the morphology created by the laser etching, whereas the machining process created the typical microscopically grooved and relatively smooth surface characteristic.

A cross-sectional SEM view of an HA-coated implant showed the presence of a "hybrid layer" (3 to 8 μ m). This region was formed by the Ti laser-modified layer and the HA coating (Fig 4).

Surface microtopographic analysis showed a statistical difference ($P < .01$) of the roughness of the MS

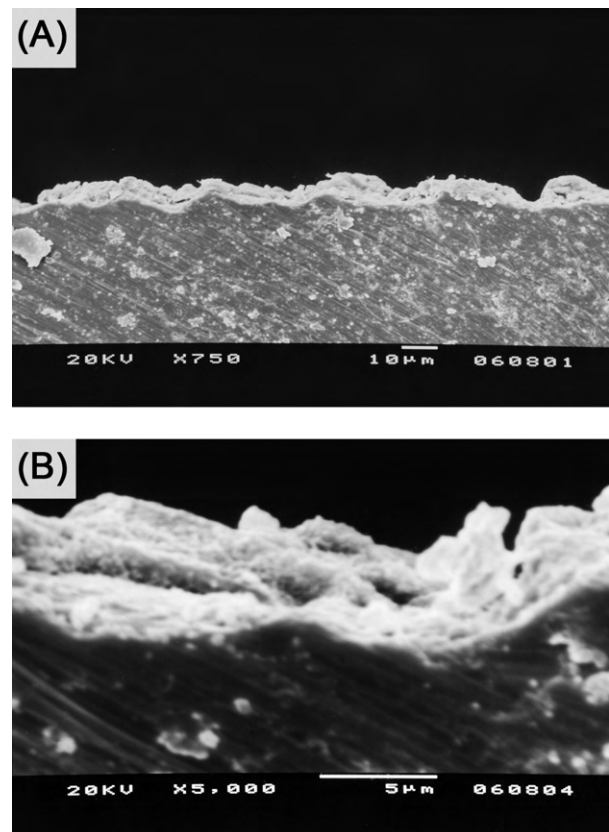


FIGURE 4. Cross-sectional SEM micrographs of HA-coated implants; original magnifications A, $\times 750$ and B, $\times 5,000$.

Faeda et al. Hydroxyapatite and Implant Surface Modification. *J Oral Maxillofac Surg* 2009.

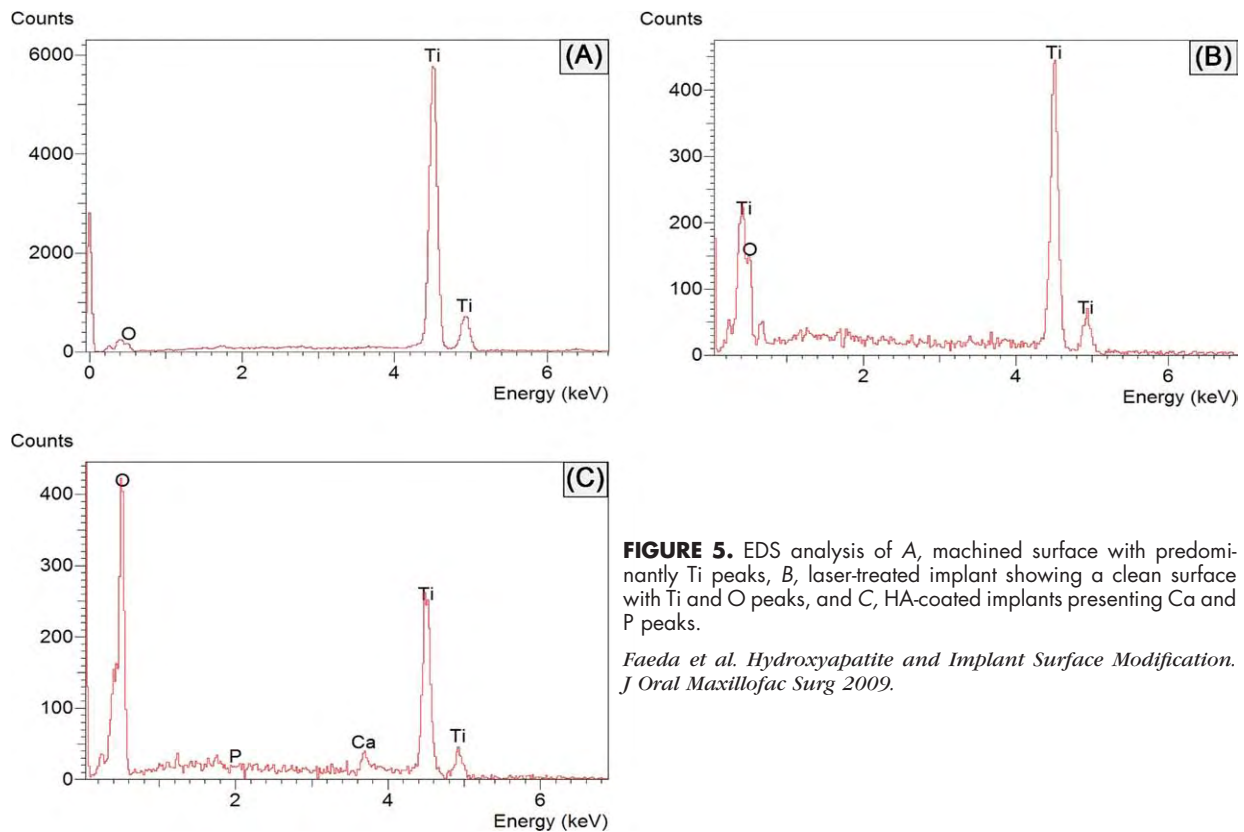


FIGURE 5. EDS analysis of A, machined surface with predominantly Ti peaks, B, laser-treated implant showing a clean surface with Ti and O peaks, and C, HA-coated implants presenting Ca and P peaks.

Faeda et al. Hydroxyapatite and Implant Surface Modification. *J Oral Maxillofac Surg* 2009.

($R_a = 0.33 \pm 0.06 \mu\text{m}$) compared with the LMS ($R_a = 1.38 \pm 0.23 \mu\text{m}$) and HA ($R_a = 1.26 \pm 0.14 \mu\text{m}$). The comparison between LMS and HA showed no statistical difference ($P < .05$).

The EDS analysis showed no contamination on the machined implants, and the same condition was observed on the laser-treated implants. On the latter, the presence of a large amount of oxygen on the surface from the melting and fast-cooling process that occurs after surface irradiation was also detected. The chemical HA-coated implants maintained the characteristics provided by the previous laser treatment, and the presence of CaP obtained by the CaP chemical deposition also was detected (Fig 5).

The surface chemical composition from EDS analysis is presented in Table 1.

Table 1. IMPLANT SURFACE CHEMICAL COMPOSITION FROM EDS ANALYSIS

Evaluated Surfaces	Chemical Elements (%)			
	Ti	O	Ca	P
LMS	83.60	16.40	0.0	.0
MS	90.19	9.81	0.0	.0
HA	62.64	34.52	2.55	.29

Faeda et al. Hydroxyapatite and Implant Surface Modification. *J Oral Maxillofac Surg* 2009.

REMOVAL TORQUE MEASUREMENTS

In general, the animals presented no disturbances in soft tissue healing or tibia fractures. There was no detection of any alteration on the surfaces during the implant insertion or removal processes, being observed by the clinical integrity of the HA coating even after the removal of the implants by the removal torque test.

The torque measurement yielded statistically significant differences ($P < .05$) among the machined, laser-etched, and chemical HA-coated groups in all periods of evaluation. The mean and standard deviation of removal torque by group and period of evaluation are summarized in Table 2.

The highest removal torque corresponded to the HA-coated implants, whereas the lowest was demonstrated by the machined implants (Fig 6).

SURFACE ANALYSIS OF TORQUED IMPLANTS

Under SEM observation, a considerably thick quantity of attached bone was observed on the surfaces of HA-coated implants, indicating that fracture had often occurred in the bone (Fig 7). A similar aspect was observed on the laser-treated surface, with a thin layer of bone covering the implant (Fig 8). In contrast, a very limited quantity of attached bone was observed on the machined implant surfaces (Fig 9) after thorough cleaning in formaldehyde solution.

Table 2. MEAN $\pm$ SD OF TORQUE REMOVAL (NEWTON CENTIMETERS) BY GROUP AND PERIOD

Periods (wk)	Evaluated Surfaces			P Value
	MS	LMS	HA	
4	23.28 $\pm$ 4.46 ^a	33.0 $\pm$ 5.8 ^b	55.42 $\pm$ 12.86 ^c	.0065 a vs b .0092 a vs c .0032 b vs c
8	24.0 $\pm$ 6.34 ^a	39.87 $\pm$ 9.58 ^b	63.71 $\pm$ 14.79 ^c	.0023 a vs b .0012 a vs c .0055 b vs c
12	33.85 $\pm$ 6.28 ^a	54.57 $\pm$ 17.73 ^b	64.0 $\pm$ 18.05 ^{bc}	.0298 a vs b .0038 a vs c .2976 b vs c

Different superscript letters indicate statistical difference at $P < .05$, Mann-Whitney U test.

Faeda et al. Hydroxyapatite and Implant Surface Modification. *J Oral Maxillofac Surg* 2009.

These results indicate that active bone apposition with strong attachment was achieved on the surfaces of HA- and laser-treated implants, which may be the reason for the higher removal torque value. No signs of surface alteration after removal torque testing were found on the surfaces of the experimental or control implants. The torqued HA-coated implants showed the original surface structures (Fig 9), indicating that the HA layer has relatively good mechanical properties including coating adhesion and mechanical strength.

Discussion

The resistance of implants to removal torque has been used in several animal studies to evaluate osseointegration.³⁵⁻³⁷ This resistance can be correlated to the degree of physicochemical interaction between mineralized bone and the implant surface.^{37,38} Thus, the implant removal torque is influenced by the adjacent mechanical bone properties, in quality and quantity, and the degree of bone-implant contact.^{37,39} Under healthy conditions, bone remodeling occurs progressively, increasing the degree of bone-implant contact and consequently increasing the torque needed to remove the implant.^{35,40}

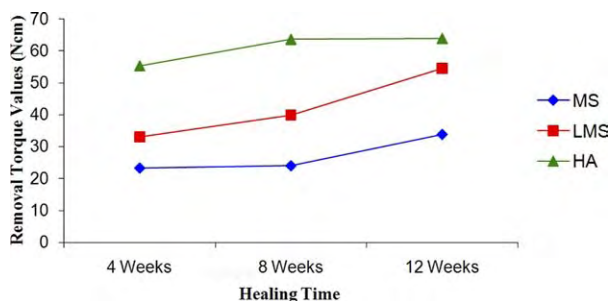


FIGURE 6. Mean of removal torque (Newton centimeters) for MS, LMS, and HA according to experimental period (weeks).

Faeda et al. Hydroxyapatite and Implant Surface Modification. *J Oral Maxillofac Surg* 2009.

The present study showed that HA implants achieved statistically higher removal torque values compared with the laser-treated and machined control group at the initial periods of healing (4 and 8 weeks) and this difference continued with the machined implants up to 12 weeks.

These results are probably related to the association between HA chemical deposition and Ti laser treatment, which induces, through a biochemical process, the HA-coating nucleation and growth into its porous structure.

The laser beam increases the Ti surface temperature to the melting point followed by a fast cooling, resulting in standard roughness microstructures and a thick TiO layer. The TiO₂ formed on this Ti cp surface has the ability to improve apatite bonding strength due to the high chemical affinity between TiO₂ and HA.²⁹

When exposed to SBF, OH groups are adsorbed by Ti ions in the oxide layer.³⁰ The TiO₂ loses protons and negative TiO groups are formed. These negative sites attract Ca²⁺ ions from the body fluid that bond to the surface.³⁰ A layer of amorphous Ca titanate is then formed and the surface becomes slightly positively charged as the layer grows due to the Ca²⁺ ions. It will then attract negatively charged P ions, which bond to the surface, and a metastable phase of CaP is formed. This layer is then crystalized into bonelike HA because it is thermodynamically more favorable for the amorphous CaP to adopt a crystalline structure in a wet environment.^{30,31}

This rough surface coated by the HA layer may act by encouraging bony ingrowth into its porous structure, providing a mechanical fixation beyond bone chemical bonding of the implant to the surrounding bone.^{41,42} The stability of this interface could be seen by the SEM analysis of the retrieved HA implants, which showed, even after higher removal torque forces, fracture of the surrounding bone and not the bone-implant or implant-coated interfaces.

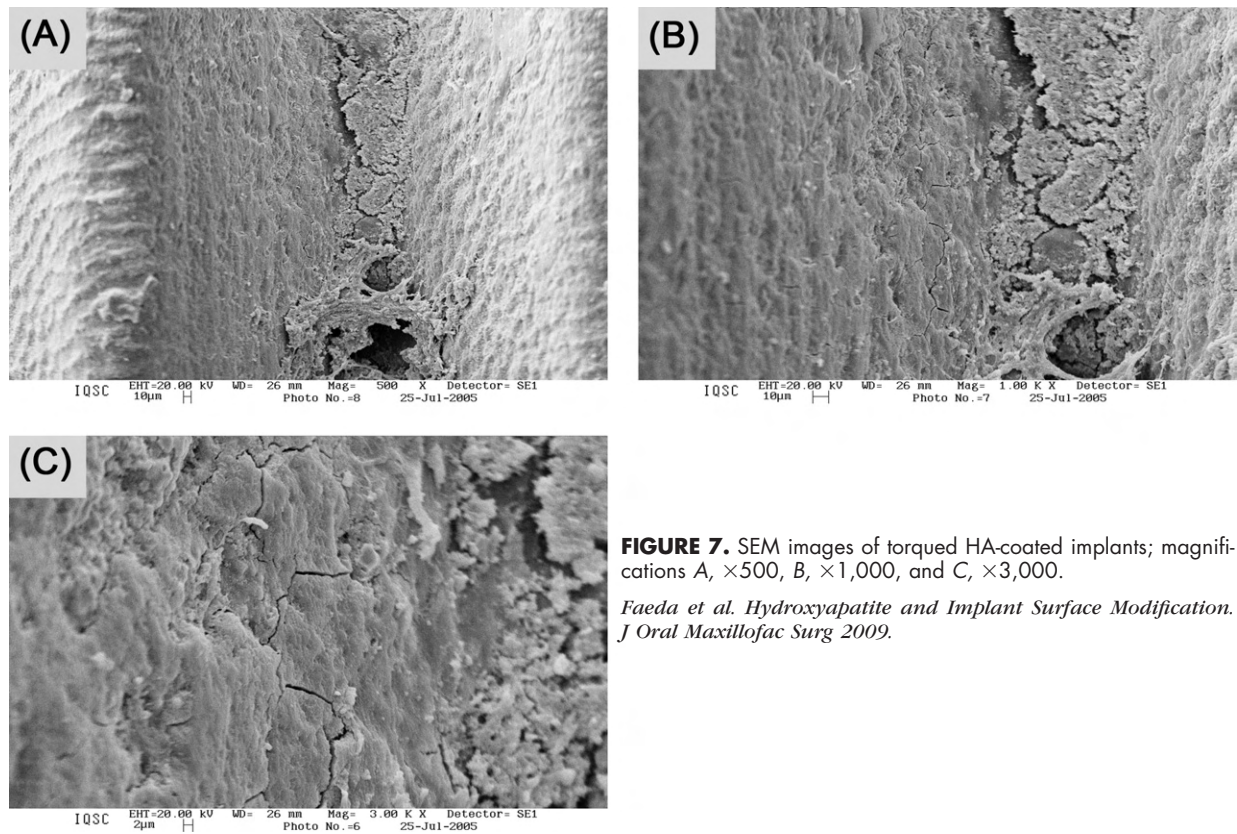


FIGURE 7. SEM images of torqued HA-coated implants; magnifications A, $\times 500$, B, $\times 1,000$, and C, $\times 3,000$.

Faeda et al. Hydroxyapatite and Implant Surface Modification. *J Oral Maxillofac Surg* 2009.

The stronger HA-implant bonding could provide long-term bone-implant fixation attained by chemical integration through the apatite layer. In contrast, absence of any chemical link between the plasma-sprayed HA and the Ti substrate leads to a limited adhesion between the coating and the implant.²¹

Plasma spray has been the usual technique for the deposition of the coatings because it has a good bone response. However, there is concern about the mechanical and chemical integrity of the coatings, partly because of their low adherence to the substrate, great thickness, low density, phase compositions that may not be controllable during the deposition process, and concern over the success rate regarding long-term stability.^{21,41-43}

Although the HA plasma-spray implant coating is obtained with a thickness of 20 to 50 μm ²⁶⁻²⁸ and a bonding strength of 7 to 20 MPa,^{19,44} the chemical apatite coatings are obtained in thin layers (50 nm to 10 μm)^{19,45} through a low-temperature process that decreases the risk of coating flake-off, resulting in a high bonding strength (35 to 70 MPa)¹⁹ to the implant surface.

Previous research about bioactive surface treatments on micrometer¹⁹ and nanometer^{1,45} scales have shown static histomorphometric and biomechanical results at short^{19,28,45} and long¹⁹ implantation times that are higher than those for uncoated implants and some-

what comparable to those of thick plasma-sprayed HA-coated implants.^{20,45,46}

In the present experimental study, it was clear that HA coating, associated with the laser treatment surface morphology, was important to bone tissue response, as reported by other investigations.^{8-10,38,39}

Some studies have shown the effect of the nano roughness on improving osseointegration.^{1,45} In the present study it was observed that laser ablation significantly increased the roughness of the implant surface because the HA implants ($R_a = 1.26 \pm 0.14 \mu\text{m}$) are rougher than implants coated by HA plasma spray ($R_a = 1.06 \pm 0.21 \mu\text{m}$).⁴³ Also, the roughness and MEV analysis showed no statistical difference between LMS and HA implant ($R_a = 1.38 \pm 0.23 \mu\text{m}$ and $R_a = 1.26 \pm 0.14 \mu\text{m}$, respectively) surface morphology. Because surface roughness was similar for the LMS and HA surfaces, the removal torque value differences between LMS and HA are probably due to the HA implant surface chemistry.

Based on studies in the literature that have described the relatively low shear and fatigue strengths of some CaP-based ceramics coatings and their delayed solubility^{47,48} and resorption¹⁰ during function, we believe that further studies are needed to demonstrate the behavior of these implant surfaces in osseointegration and stability during function and peri-implant disease. Also,

considering the low costs and viability to large-scale production, these methods of Ti surface bioactivity modification should be considered, with great clinical applicability in dentistry and orthopedics.

Within the limitations of the present study, the biomechanical data suggested that the implants with laser surface modification associated with HA chemical coating can shorten the implant healing period by the increase of bone-implant interaction during the first 2 months after implant placement. Further studies will be done to demonstrate the behavior of these implant sur-

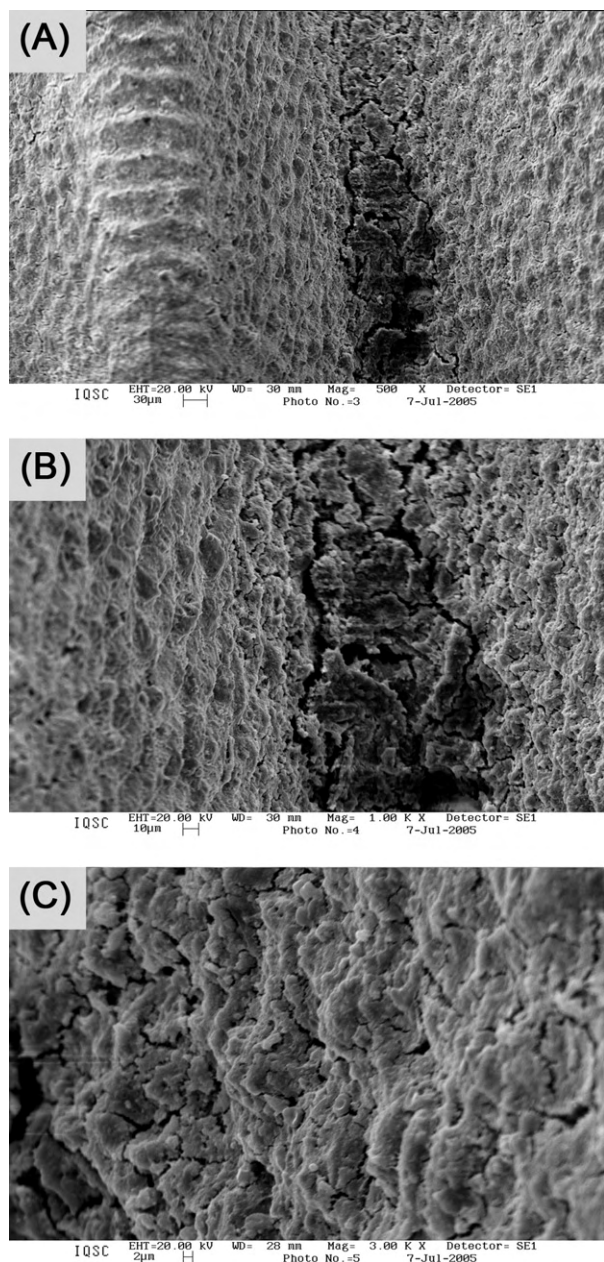


FIGURE 8. SEM images of torqued laser-treated implants; magnifications A, $\times 500$, B, $\times 1,000$, and C, $\times 3,000$.

Faeda et al. Hydroxyapatite and Implant Surface Modification. *J Oral Maxillofac Surg* 2009.

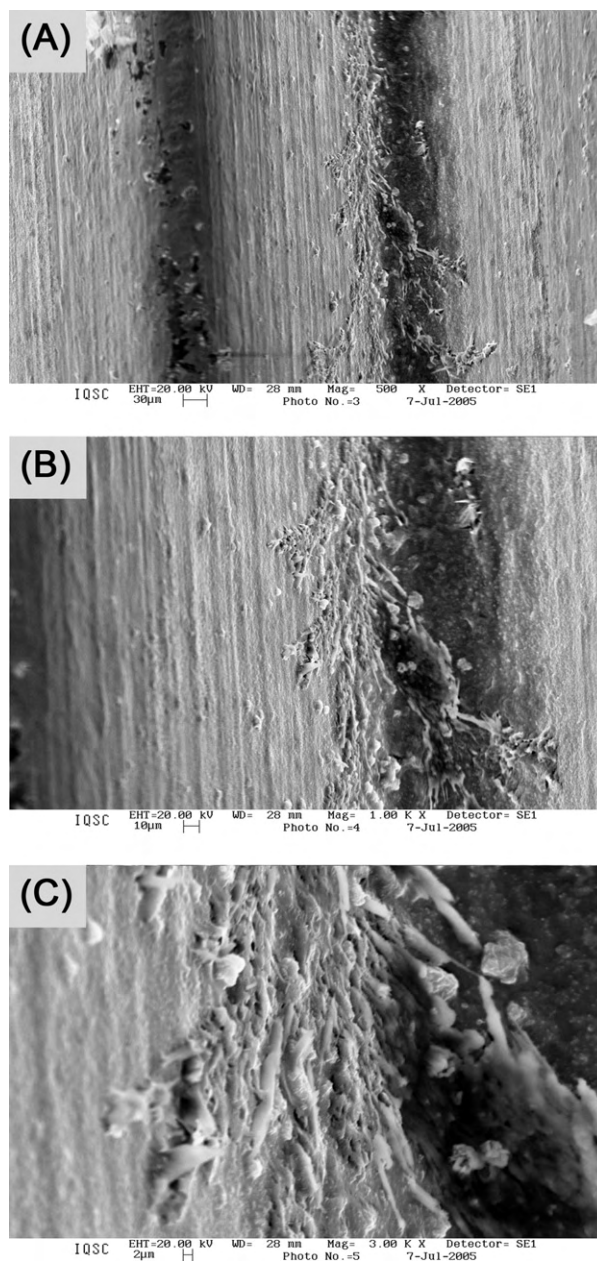


FIGURE 9. SEM images of torqued machined implants; magnifications A, $\times 500$, B, $\times 1,000$, and C, $\times 3,000$.

Faeda et al. Hydroxyapatite and Implant Surface Modification. *J Oral Maxillofac Surg* 2009.

faces in osseointegration under histomorphometric analysis.

Acknowledgments

The authors greatly appreciated the assistance of AS Technology and Aditek-Brazil for the technical support.

References

1. Orsini G, Piattelli M, Scarano A, et al: Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *J Periodontol* 78:209, 2007

2. Klokkevold PR, Nishimura RD, Adachi M, et al: Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res* 8:442, 1997
3. Cho SA, Jung SK: A removal torque of the laser-treated titanium implants in rabbit tibia. *Biomaterials* 24:4859, 2003
4. Ledermann PD, Schenk RK, Buser D: Long-lasting osseointegration of immediately loaded, bar-connected TPS screws after 12 years of function: A histologic case report of a 95-year-old patient. *Int J Periodont Restor Dent* 18:552, 1998
5. 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* 12:196, 2001
6. Torensma R, Ter Brugge PJ, Jansen JA, et al: Ceramic hydroxyapatite coating on titanium implants drives selective bone marrow stromal cell adhesion. *Clin Oral Implants Res* 14:569, 2003
7. Gotfredsen K, Wennerberg A, Johansson C, et al: Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: An experimental study with rabbits. *J Biomed Mater Res* 29:1223, 1995
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* 74:945, 2003
9. Buser D, Mericske-Stern R, Bernard JP, et al: Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part I. 8-Year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clin Oral Implants Res* 8:161, 1997
10. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, et al: Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 25:889, 1991
11. Gaggl A, Schultes G, Muller WD, et al: Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces—A comparative study. *Biomaterials* 21:1067, 2000
12. Hallgren C, Reimers H, Chakarov D, et al: An in vivo study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. *Biomaterials* 24:701, 2003
13. Albrektsson T, Wennerberg A: Oral implant surfaces: Part 1—Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 17:536, 2004
14. Albrektsson T, Wennerberg A: Oral implant surfaces: Part 2—Review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont* 17:544, 2004
15. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE: The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials* 28:4748, 2007
16. Davies JE: Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 8:932, 2003
17. Dong XL, Zhou HL, Wu T, et al: Behavior regulation of adsorbed proteins via hydroxyapatite surface texture control. *J Phys Chem B* 15:4751, 2008
18. Shen JW, Wu T, Wang Q, et al: Molecular simulation of protein adsorption and desorption on hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials* 5:513, 2008
19. Park YS, Yi KY, Lee IS, et al: The effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the grit-blasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20:31, 2005
20. Yang W-Q, Lin RM, Nakamura T, et al: Bonding of chemically treated titanium implants to bone. *J Biomed Mater Res* 37:267, 1997
21. Nogueras-Bayona J, Gil FJ, Salsench J, Martinez-Gomis J: Roughness and bonding strength of bioactive apatite layer on dental implants. *Implant Dent* 13:185, 2004
22. Suchanec W, Yoshimura M: Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J Mater Res* 13:94, 1998
23. LeGeros RZ: Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 395:81, 2002
24. Sun L, Berndt CC, Gross KA, et al: Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: A review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 58:570, 2001
25. Bigi A, Boanini E, Bracci B, et al: Nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium: A new fast biomimetic method. *Biomaterials* 26:4085, 2005
26. Lacefield WR: Current status of ceramic coatings for dental implants. *Implant Dent* 7:315, 1998
27. Lacefield WR: Hydroxyapatite coatings. *Ann N Y Acad Sci* 523:72, 1988
28. Ong JL, Carnes DL, Bessho K: Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. *Biomaterials* 25:4601, 2004
29. Kim HW, Koh YH, Lee LH, et al: Hydroxyapatite coatings on titanium substrate with titania buffer layer processed by sol-gel method. *Biomaterials* 25:2533, 2004
30. Svetina M, Colombi Ciacchi L, Sbaizero O, et al: Deposition of calcium ions on rutile (110): A first-principles investigation. *Acta Mater* 49:2169, 2001
31. Forsgren J, Svahn F, Jarmar T, et al: Formation and adhesion of biomimetic hydroxyapatite deposited on titanium substrates. *Acta Biomater* 6:980, 2007
32. Braga FJC, Marques RFC, Filho EA, et al: Surface modification of Ti dental implants by Nd:YVO₄ laser irradiation. *Appl Surf Sci* 23:9203, 2007
33. Moritz N, Jokinen M, Peltola T, et al: Local induction of calcium phosphate formation on Ti O₂ coatings on titanium via surface treatment with a CO₂ laser. *J Biomed Mater Res* 65:9, 2003
34. Kokubo T, Ito S, Hayashi T, et al: Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res* 24:331, 1990
35. Johansson C, Albrektsson T: Integration of screw implants in the rabbit. A 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2:69, 1987
36. Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M, et al: The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: A study in rabbits. *Implant Dent* 12:333, 2003
37. Sennerby L, Thomsen P, Ericson LE: A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7:62, 1992
38. Carlsson L, Rostlund T, Albrektsson B, et al: Removal torques for polished and rough titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 3:21, 1988
39. Ivanoff CJ, Widmark G, Johansson C, et al: Histological evaluation of bone response to oxidized and turned titanium microimplants in human jawbone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18:341, 2003
40. Sakakura CE, Margonar R, Holzhausen M, et al: Influence of cyclosporin-a therapy on bone healing around titanium implants. A histometric and biomechanic study in rabbits. *J Periodontol* 74:976, 2003
41. Block MS, Gardiner D, Kent JN, et al: Hydroxyapatite-coated cylindrical implants in the posterior mandible: 10-Year observations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11:626, 1996
42. McGlumphy EA, Peterson LJ, Larsen PE, et al: Prospective study of 429 hydroxyapatite-coated cylindrical Omniloc implants placed in 121 patients. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18:82, 2003
43. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, et al: Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 7:844, 2007
44. Kim HW, Kim HE, Salih V, et al: Hydroxyapatite and Titania Sol-gel composite coatings on titanium for hard tissue implants; mechanical and in vitro biological performance. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 1:1, 2005
45. Coelho PG, Cardaropoli G, Suzuki M, et al: Early healing of nanothickness bioceramic coatings on dental implants. An experimental study in dogs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 88:387, 2009
46. Yang Y, Kim KH, Ong JL: A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process—An alternative to plasma spraying. *Biomaterials* 26:327, 2005
47. Lemons JE: Hydroxyapatite coatings. *Clin Orthop Relat Res* 235:220, 1988
48. Martins MC, Shibli JA, Abi-Rached RS, et al: Progression of experimental chronic peri-implantitis in dogs: Clinical and radiographic evaluation. *J Periodontol* 76:1367, 2005

Laser surface modification of dental implants previously Biomimetic hydroxyapatite chemical coating. Histomorphometric study in rabbits.

ABSTRACT

Purpose: Considering the great biological potential of the association between laser ablation and hydroxyapatite thin layer coatings to create an interesting bioactive environment on titanium dental implants, the aim of the present study was to investigate, by histomorphometrical analysis, the histological effects of a surface treatment created by laser-ablation (Nd:YAG) and, later, thin deposition of HA particles by a chemical process compared to implants with only laser-ablation and implants with machined surfaces.

Materials and Methods: Forty-eight rabbits received one implant by tibiae of the following surfaces: Machined surface (MS), laser-modified surface (LMS) and biomimetic hydroxiapatite coated surface (HA). After 4, 8 and 12 weeks of healing, the implants and surrounding bone were removed and prepared by a calcified histological process. The percentage of bone-to-implant contact (BIC) and the bone area formed between the threads (BBT) were evaluated separately to the cortical and endosteal region.

Results: Average BIC percentage in the cortical region was significantly higher ($P < 0.001$) on the LMS and HA implants, compared with MS ones for all periods of healing, having no statistical differences between LMS and HA. When compared in the endosteal area, the LMS and HA implants

showed statistically higher ($P<0.01$) BIC percentage values than MS at the initial periods of healing (LMS after 4 weeks and HA after 4 and 8 weeks, respectively). The LMS and HA implants showed similar mean values in all evaluated periods in the cortical region, but a tendency of higher mean values for HA in the endosteal region was observed in all periods of the study. For the BBT% in the cortical region, HA implants were significantly superior to MS ($P<0.05$) after 4 weeks of implantation, and in the endosteal area, the HA was superior to the SU implants ($P<0.05$) only after 12 weeks of healing, having no differences for the other comparisons and periods. The surface characterization showed a deep, rough and regular topography provided by the laser conditioning, that was followed by the HA coating.

Conclusions: Based on these results, it was possible to conclude that the HA biomimetic coating with previous laser surface modification, have the potential to induce the contact osteogenesis and allow the formation of a more stable bone-implant interface, even in earlier periods.

1. INTRODUCTION

The actual implantology has demonstrated that there is an increasing trend to install oral implants on more challenging cases, like that with immediate or early loading protocols, implant placement in sites that lack sufficient height and width of the residual alveolar ridge, and in patients with poor wound healing due to, diabetes, other metabolic

deficiencies, osteoporosis, radiation therapy, etc. As a consequence, there is a need to establish surfaces that will lead to a predictive improvement of an implant-to-bone response (1).

Surface texture and chemistry modification methods (titanium[2, 3] and hydroxyapatite plasma spray,[4, 5] acid etching,[6, 7] acid etching associated with sandblasting by either AlO_2 or TiO_2 ,[8, 9] and laser ablation[10-12]) have been successful in increasing the host response and consequently the bone-to-implant contact, and bone mechanical properties at early implantation times (13, 14).

Among surface chemistry modifications, the incorporation of Ca- and P-based bioceramics onto the implant surfaces through various manufacturing processes has been investigated throughout the last two decades (9, 12, 13, 15). Ca-P ceramics are known for their bioactive properties. Generally, bioactive materials interact with surrounding bone, resulting in the formation of a chemical bond to this tissue (“bone-bonding”).

From a commercial point of view, the most successful method to apply CaP coatings to titanium implants has been through the plasma-spraying technique. Hydroxyapatite (HA) coating by plasma spraying has been used since the mid-1980's (16), and some clinical investigations have shown promising results (16, 17). Plasma-sprayed HA coating, however, still has such problems as a thick coating layer, coating delamination, cohesive and adhesive failures, and porosity of the coating

layer (16, 18). Various methods have been developed and tested throughout the last decade in order to coat metal implants with Ca and P ions, also known as plasma-spraying, sputter-deposition, sol–gel coating, electrophoretic deposition or biomimetic precipitation (1).

With the intention to take advantage of the biological benefits of the Ca-P based coating, different methods of thin-thickness coating have been developed. The chemical deposition of hydroxyapatite on the surface permits the control of the coating thickness, enhancing the adhesion to the metallic substrate (14, 15, 19-21). The strong bone implant bonding, mediated by the hydroxyapatite layer, requires a reliable chemical link between the coating and titanium implant surface. One way to enhance the physicochemical connection between the titanium surface and Ca-P base coating, is through the laser ablation treatment (22, 23).

The laser beam increases the titanium surface temperature to the melting point followed by a fast cooling, which results in unique microstructures with greatly increased hardness and corrosion resistance, a high degree of purity, standard roughness, and a thick titanium oxide layer (10-12, 22). The titanium oxide layer formed is composed of different Ti oxides, among them the TiO_2 , which when exposed to body fluids suffers a deprotonization. Negative Ti–O groups are also formed, attracting Ca^{2+} ions from the body fluids that bond to the surface (24). A layer of Ca^{2+} ions becomes slightly positively charged and attract negatively charged phosphate ions, which bond to the surface, and a

metastable phase of calcium phosphate is formed (25). This biochemical process allows for a more stable hydroxyapatite coating layer that is strongly bonded to the titanium implant surface.

According to the literature, the association between laser ablation and the hydroxyapatite thin layer coatings create an interesting bioactive environment on titanium dental implants with great biological potential (23). Therefore, the aim of the present study was to investigate by histomorphometrical analysis, the histological effects of the surface treatment created by laser-ablation and the thin deposition of HA particles by a chemical process, finally comparing them to the implants with only laser-ablation and implants with machined surfaces.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Implant surface preparation

Seventy-two commercially pure, titanium dental implants (Titanium Fix[®], AS Technology, Brazil) were used in this study. The implants were 10 mm long and 3.75 mm in outer diameter. Twenty-four implants were left machined (as received from the manufacturer) as controls (machined - MS), and the remaining 48 implants had the surface modified by a laser ablation process (laser modified surface - LMS) (22).

Laser Surface Modification (LMS): The implants were taken directly from the sterile package, without any additional preparation prior to laser treatment. The laser treatment was carried out at a 1064 nm wavelength

(λ) irradiation, at a pulse frequency of 20 to 35 kHz (ν), scanning speed ranging between 80 and 300 mm/s, scanning space from 0.1 to 0.2 mm/s, laser pulses interval between 300 ns, and energy from 90 to 100 mJ/pulse using a pulsed Nd:YAG laser (DigiLaser – DML-100, Violino 10) (26).

Chemical Hydroxyapatite Coating (HA): In order to coat the implants with hydroxyapatite, the implants were previously prepared by laser ablation, as described above, to create a complex surface morphology and to optimize the hydroxyapatite nucleation on the implant surface (24, 25, 27). Then, to the chemical coating, the implants were subjected to a treatment of 5M NaOH solution at 60°C for twenty-four hours and to a subsequent heat treatment at 60°C for three hour. After this, the samples were immersed in a sodium silicate solution for twenty-four hours at 37°C. Subsequently, the implants were treated with a SBF (Simulated Body Fluid) solution for twenty-four hours at 37°C, for the slow and organized nucleation of apatite on the implant surface. After this, the implants were immersed for six days at 37°C in a solution 1,5 SBF for the growth of hydroxyapatite. The SBF solution was refreshed every twenty-four hours. After the implants' coating, the same were heat treated at 800°C at a heating rate of 5°C/min per hour, being subsequently, slowly cooled inside the oven (28).

After treatments, the implants were sent to the manufacturer (AS Technology, Brazil) to be cleaned, sterilized and packaged.

2.2. Surface characterization

Topographic evaluation was performed under scanning electron microscopy-SEM (LEO 440) to compare the surface morphology of laser-treated, chemical hydroxyapatite coating and machined implants. To evaluate the surface's chemical composition, an energy dispersive analysis of X-ray spectroscopy (EDS – LEO 440) was used.

The average roughness R_a (the arithmetic mean of the sampling area roughness, measured in μm) of each surface was analyzed using a digital profilometer (Mitutoyo SJ-301).

2.3. Animals and Surgical procedures

Forty-eight New Zealand white rabbits, 9 to 12 months old (3500 to 4500g), were used in the study. The animals were kept in individual cages, fed a standard laboratory diet, and given tap water *ad libitum*. The experiment was approved by the Animal Experimentation Committee of Araraquara Dental School in São Paulo.

A total of 72 implants (3.75 x 10 mm), 24 on each surface, were placed in the rabbit tibias (48 animals), and evaluated after 4, 8 and 12 weeks of healing.

The animals were anesthetized through intramuscular injection of a combination of ketamine (0.35 mg/kg of body weight) and xylazine (0.5 mg/kg of body weight). The region of the tibial metaphysis was cleaned

with iodine surgical soap. Before surgery, 1ml of scandicaïne® 2% (Spécialités Sptodont, Sain – Maur, França) was administered subcutaneously in the intended surgical site. The operation was performed under aseptic conditions. Incisions of approximately 3 cm in length were performed bilaterally at the internal side of the hind leg, just below the knee. After dissection, the bone surface of the tibial metaphysis was exposed. Bicortical implant beds were prepared by using a progressive sequence of spiral drills under saline cooling. One implant of each surface was placed in each tibia near the knee joint. The soft tissues were sutured in separate layers and the animals postoperatively received a single intramuscular prophylactic dose of antibiotic (0.1 ml/kg of body weight).

2.4. Specimen preparation and histomorphometric evaluation

The animals were killed according to the experimental periods (4, 8 and 12 weeks) with an intramuscular lethal overdose of ketamine (5 mg/kg of body weight).

Specimen blocks of the implants and the surrounding tissues were retrieved, immersed in 4% neutral-buffered formaldehyde and processed for ground section according to the method described by Donath & Breuner (1982)(29). The blocks were dehydrated in ascending series of ethanol (60– 100%) and subsequently infiltrated and polymerized in light-curing resin (Technovit 7200 VLC, Heraeus Kultzer GmbH & Co., Wehrheim, Germany). The blocks incorporating the implant and bone

were cut in one central section using a cutting–grinding unit (Exakt Apparatebau, Hamburg, Germany). The final sections were approximately 45 μm thick and were stained with Stevenel's blue plus acid fuccin and analyzed in a light microscope (DIASTAR - Leica Reichert & Jung products, Germany). Histomorphometry evaluations were performed with image analysis software (UTHSCSA ImageTool® version 3.0 - Health Science Center – University of Texas at Austin– USA). The percentage of bone-to-implant contact (BIC) and the bone area formed between the threads (BBT) were evaluated separately to the cortical and endosteal region.

2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis of BIC and BBT was performed by using the ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test, and differences were considered statistically significant at $\alpha=0.05$.

3.RESULTS

3.1. Topographic (SEM) and chemical (EDS) evaluation

Scanning electron microscopy of the laser-treated, chemical hydroxyapatite coating and machined surfaces demonstrated microscopic differences in the surface topography. SEM surfaces are seen in Figure 1. Laser etching created a deep and regular morphological pattern with small

pores. The hydroxyapatite coating was deposited on the surface following the morphology created by the laser etching, while a machining process created the typical microscopically grooved and relatively smooth surface characteristic.

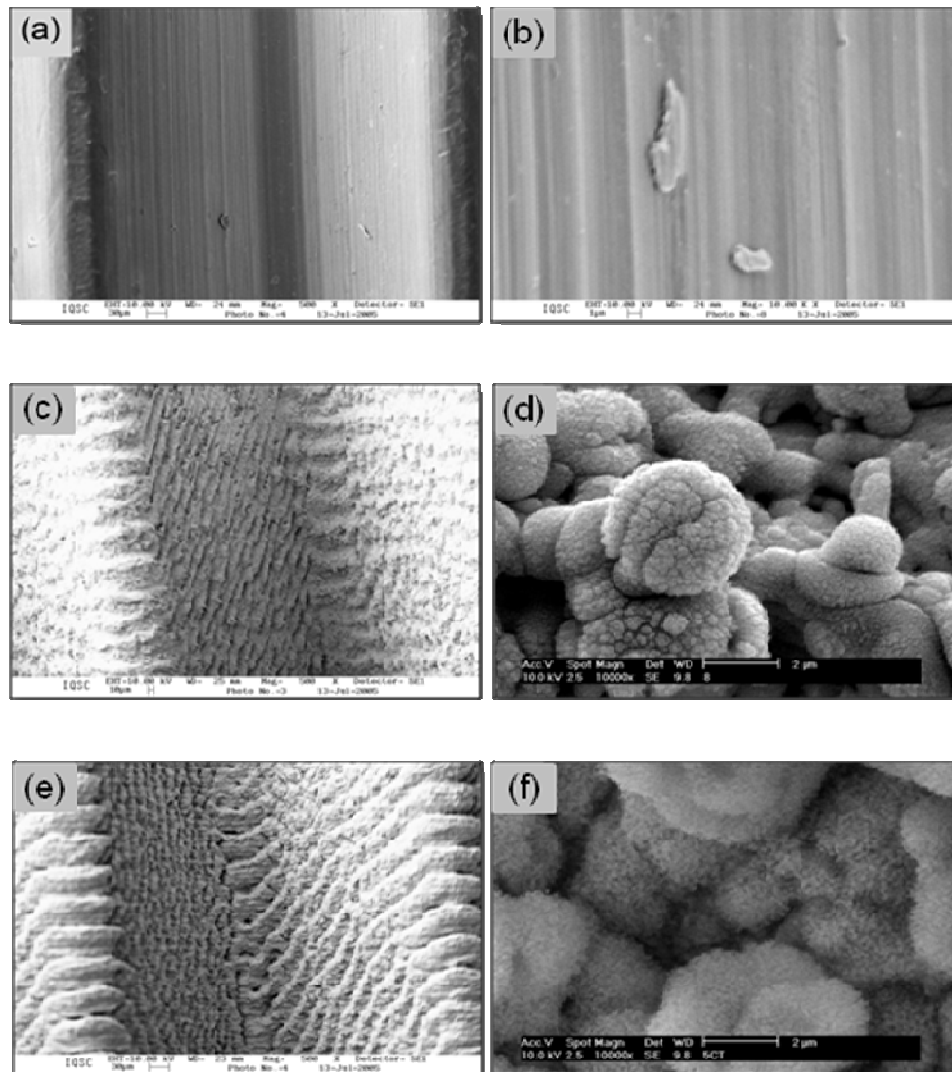


Figure 1. SEM micrographs of the implants surfaces with original magnification of machined surface (a) 500x and (b) 10000x, LMS (c) 500x and (d) 10000x, and HA (e) 500x and (f) 10000x.

A cross-section SEM view of a HA coated implant showed the presence of a “hybrid layer” (3 to 8 μm). This region was formed by the titanium laser modified layer and the hydroxyapatite coating (Figure 2).

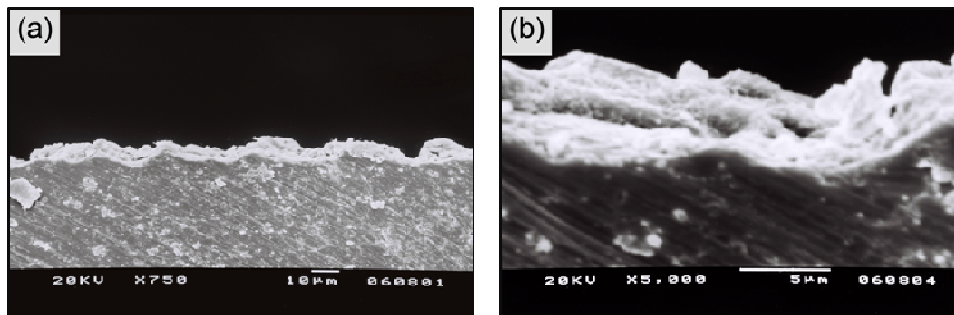


Figure 2. Cross-section SEM micrographs of the HA implants, original magnification of (a) 750x and (b) 5000x.

The surface micro-topography analysis showed a statistical difference ($p < 0.01$) of the roughness when MS was compared to LMS and HA. The comparison between LMS and HA showed no statistical difference ($p < 0.05$).

The EDS analysis showed no contamination on the machined implants, whereas the same condition was observed on the laser-treated implants. On the latter, the presence of a great amount of oxygen on the surface from the melting and fast cooling process that occurs after the surface irradiation was also detected. The chemical HA coated implants maintained the characteristics provided by the previous laser treatment, the presence of calcium and phosphorus obtained by the CaP chemical

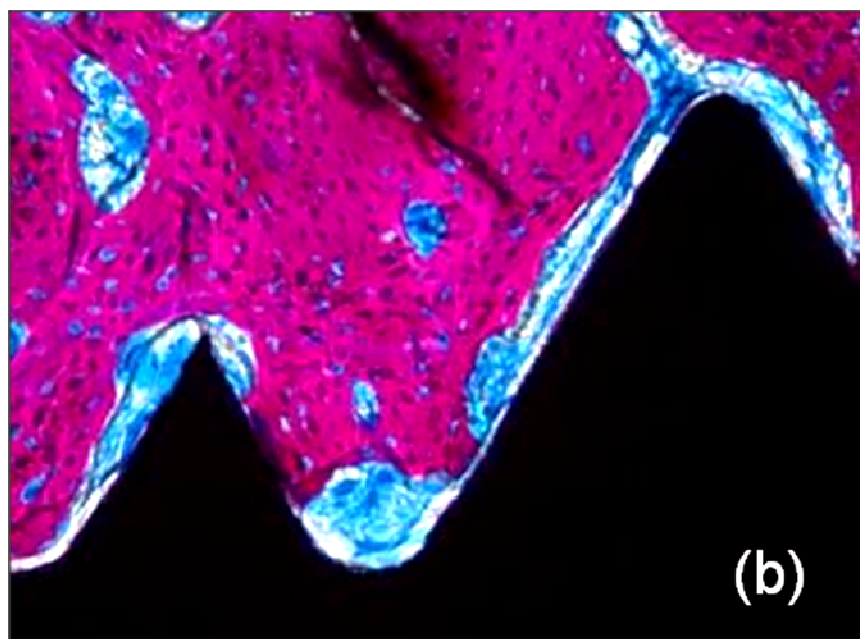
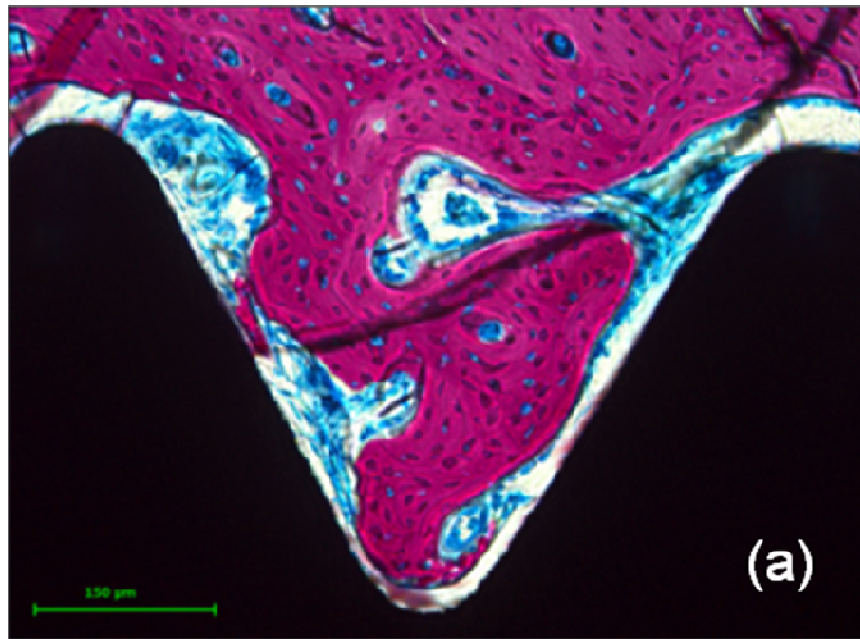
deposition was detected. The surface roughness and chemical composition from EDS analysis are presented in Table1.

Table 1. Implant surface roughness (R_a) and chemical composition from EDS analysis

Evaluated Surfaces	Chemical elements (%)				Roughness
	Ti	O	Ca	P	R_a
MS	90.19	9.81	0.0	0.0	0.33 ± 0.06 μm
LMS	83.60	16.40	0.0	0.0	1.38 ± 0.23 μm
HA	62.64	34.52	2.55	0.29	1.26 ± 0.14 μm

3.2. Histomorphometric evaluation

Histomorphometrical measurements in the cortical region revealed significantly ($P < 0.001$) higher BIC% on the LMS and HA implants compared with MS for all periods of healing, which had no statistical differences between LMS and HA. When compared in the endosteal area, the LMS and HA implants showed statistically higher ($P < 0.01$) BIC% values than MS at the initial periods of healing (LMS after 4 weeks and HA after 4 and 8 weeks, respectively). The LMS and HA implants showed similar mean values in all evaluated periods in the cortical region. There was also a tendency of higher mean values for HA in the endosteal region which was observed through all periods of the study. (Table 2 and 3)(Figures 3-5)



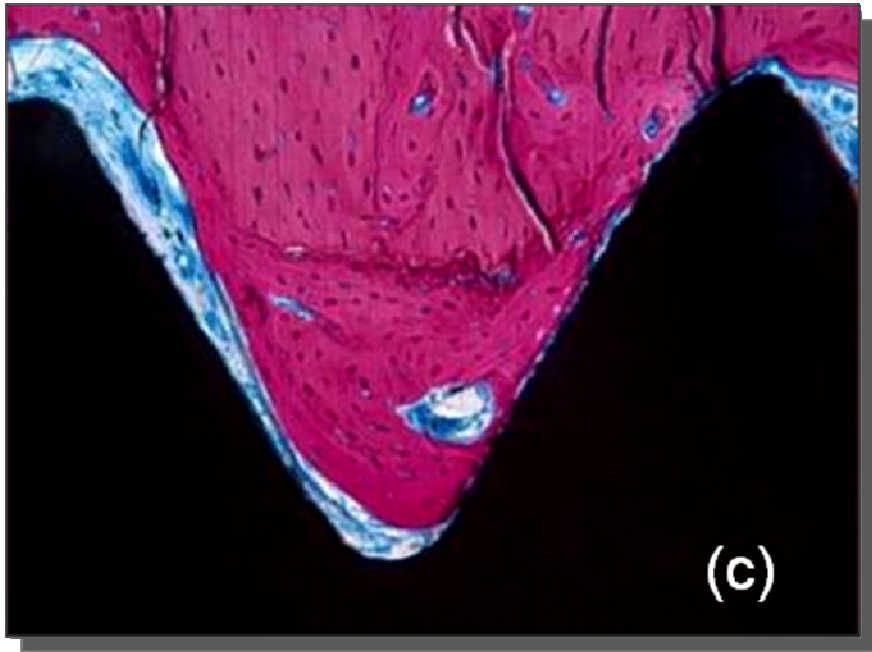
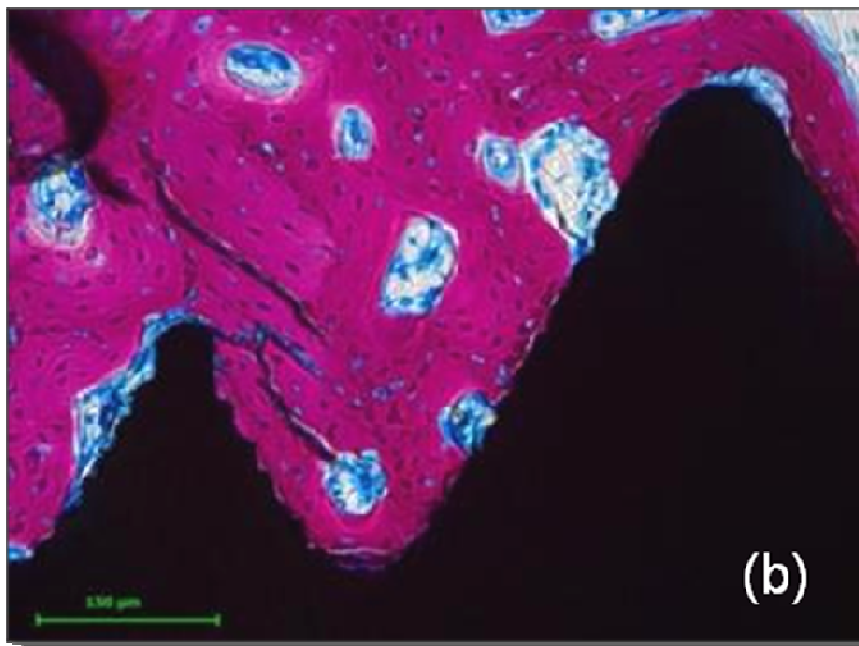
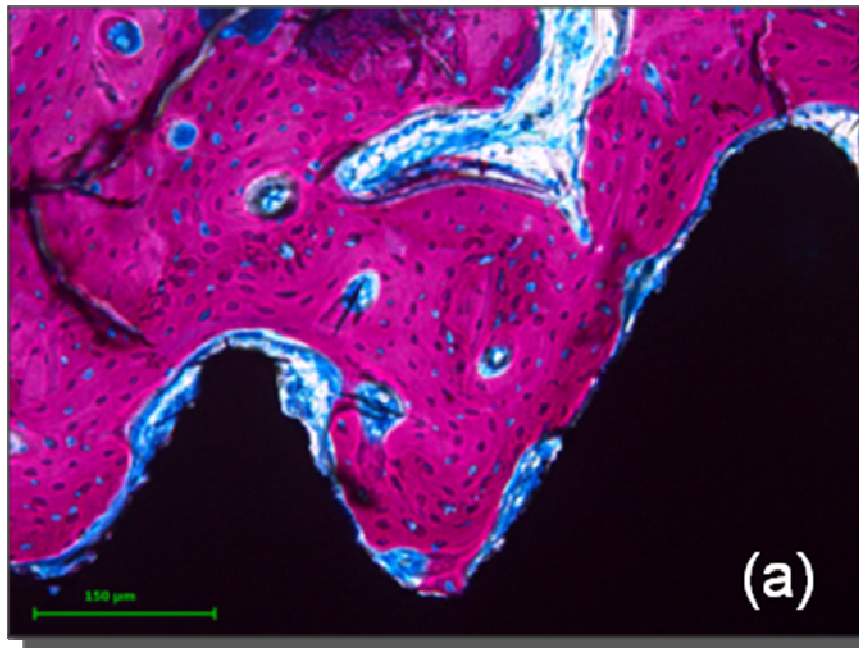


Figure 3. Histological ground section of the machined implants depicting the newly-formed bone showing early maturing and remodeling stages. (a) 4 weeks, (b) 8 weeks and (c) 12 weeks of healing. Note the lack of connecting bridges between the new bone trabeculae the machined surface at early periods, and a time dependent maturation (Stevenel's blue plus acid fuccin, original x 200 magnification).



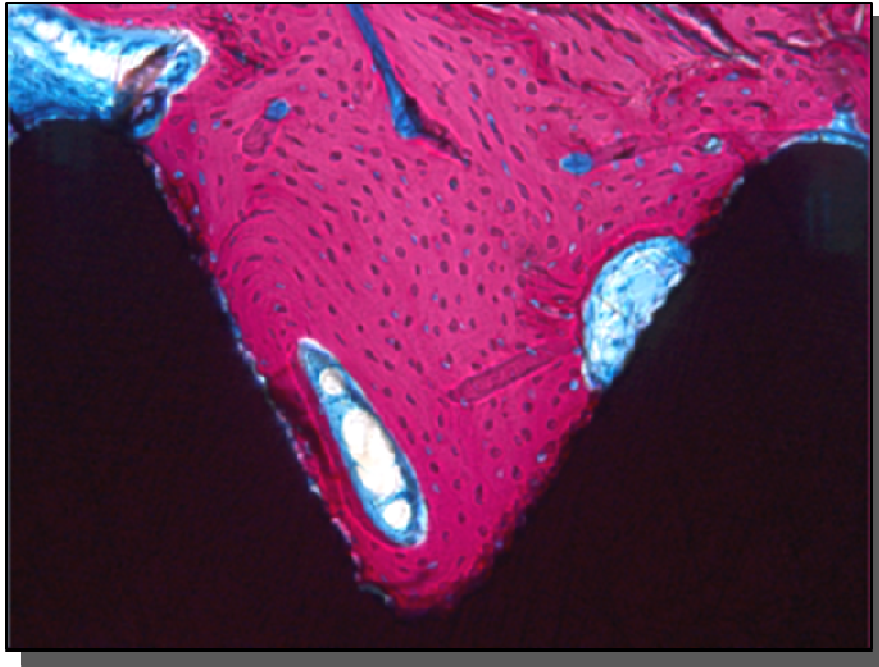
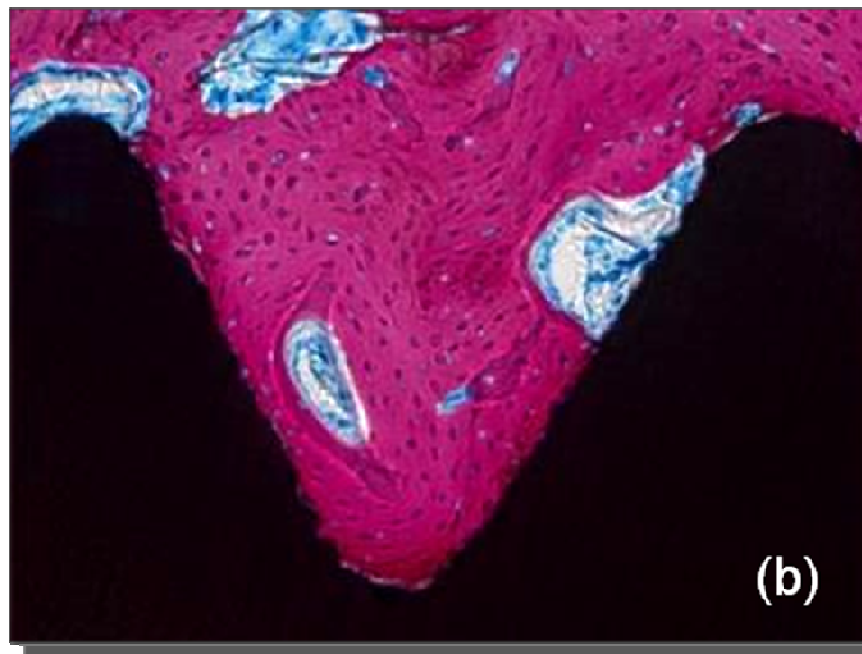
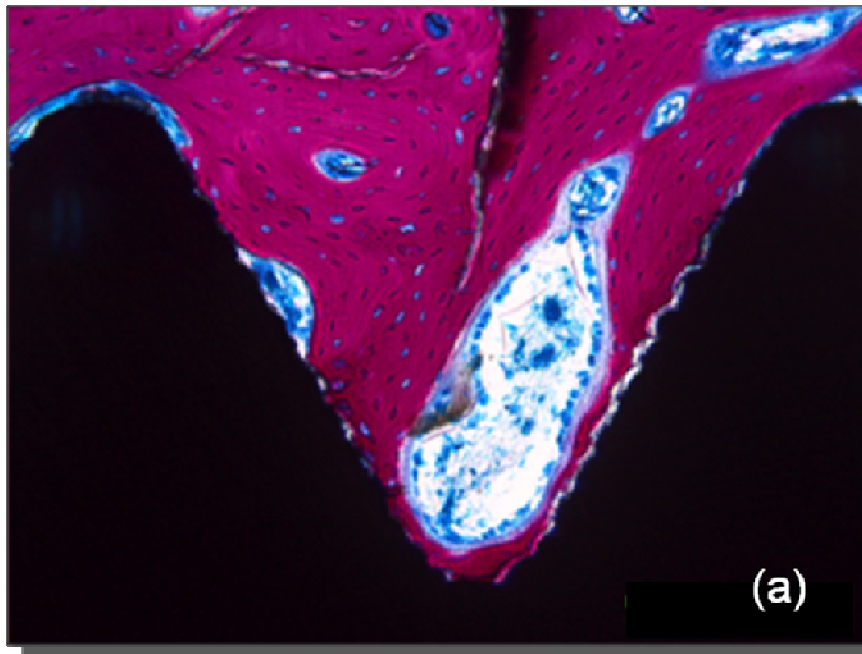


Figure 4. Histological ground section of the Laser modified surface implants, depicting the newly-formed bone showing early maturing and remodeling stages, (a) 4 weeks, (b) 8 weeks and (c) 12 weeks of healing. Note the osteoconductive capacity of the surface and its effect in guiding bone formation across the surface (Stevenel's blue plus acid fuccin, original x 200 magnification).



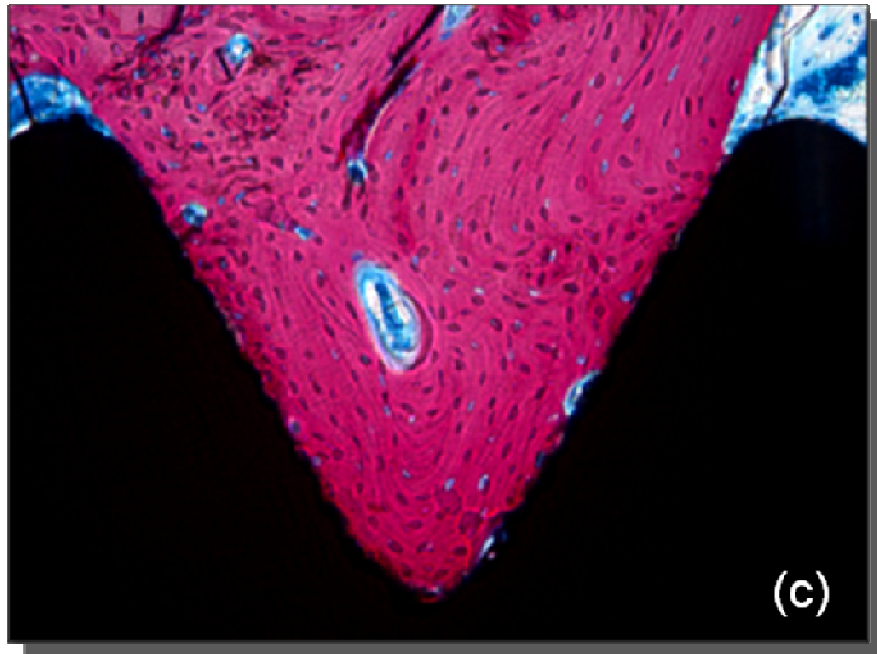


Figure 5. Histological ground section of the biomimetic coated implants, depicting the newly-formed bone showing early maturing and remodeling stages, (a) 4 weeks, (b) 8 weeks and (c) 12 weeks of healing. Note the acceleration on bone maturation when compared to the other surfaces. A thin layer of bone tissue with osteoblasts is in direct contact with the hydroxyapatite surface, and an osteoblast line indicating continuous bone formation in close contact with the surface (Stevenel's blue plus acid fuccin, original x 200 magnification).

Table 2. Bone to implant contact percentage (mean $\pm$ SD) at cortical area by group and healing period

Periods (Week)	Evaluated Surfaces			<i>P value</i>
	MS	LMS	HA	
4	33.63 $\pm$ 4.03 ^A	59.99 $\pm$ 3.69 ^B	64.36 $\pm$ 8.33 ^B	(AB) < 0.001
8	34.41 $\pm$ 7.08 ^A	60.36 $\pm$ 9.50 ^B	63.43 $\pm$ 8.46 ^B	((AB) < 0.001
12	46.29 $\pm$ 6.99 ^A	67.30 $\pm$ 9.87 ^B	72.97 $\pm$ 7.75 ^B	(AB) < 0.001

(A, B) different letters indicate the statistical difference at $P < 0.05$,

ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

Table 3. Bone to implant contact percentage (mean $\pm$ SD) at endosteal area by group and healing period

Periods (Week)	Evaluated Surfaces			<i>P value</i>
	MS	LMS	HA	
4	0.61 $\pm$ 1.62 ^A	7.65 $\pm$ 4.38 ^B	10.06 $\pm$ 1.89 ^B	(AB) < 0.001
8	8.57 $\pm$ 3.23 ^A	12.40 $\pm$ 7.00 ^{AB}	17.54 $\pm$ 8.21 ^{BC}	(AC) < 0.01
12	7.91 $\pm$ 9.95 ^A	13.83 $\pm$ 3.71 ^A	19.43 $\pm$ 5.01 ^A	(n/s)

(A, B, C) different letters indicate the statistical difference at $P < 0.05$,

ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

With regard to bone area in the threads (BBT) in the cortical region, HA implants were significantly superior to MS ($P < 0.05$) after four weeks of implantation, having no statistical differences for the other comparisons. Similar behavior was observed in the endosteal area, where the HA was superior to the MS implants ($P < 0.05$) after only 12 weeks of

healing, having no differences for the other comparisons and periods.
(Tables 4 and 5)

Table 4. Bone between threads percentage (mean $\pm$ SD) at cortical area by group and healing period

Period s (Week)	Evaluated Surfaces			<i>P value</i>
	MS	LMS	HA	
4	58.22 $\pm$ 3.81 ^A	63.53 $\pm$ 3.34 ^{AB}	67.03 $\pm$ 8.53 ^{BC}	(AC) < 0.05
8	64.93 $\pm$ 4.94 ^A	63.57 $\pm$ 12.70 ^A	68.44 $\pm$ 9.59 ^A	(n/s)
12	72.38 $\pm$ 6.47 ^A	69.12 $\pm$ 7.28 ^A	68.12 $\pm$ 6.56 ^A	(n/s)

(A, B, C) different letters indicate the statistical difference at $P < 0.05$,

ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

Table 5. Bone between threads percentage (mean $\pm$ SD) at endosteal area by group and healing period

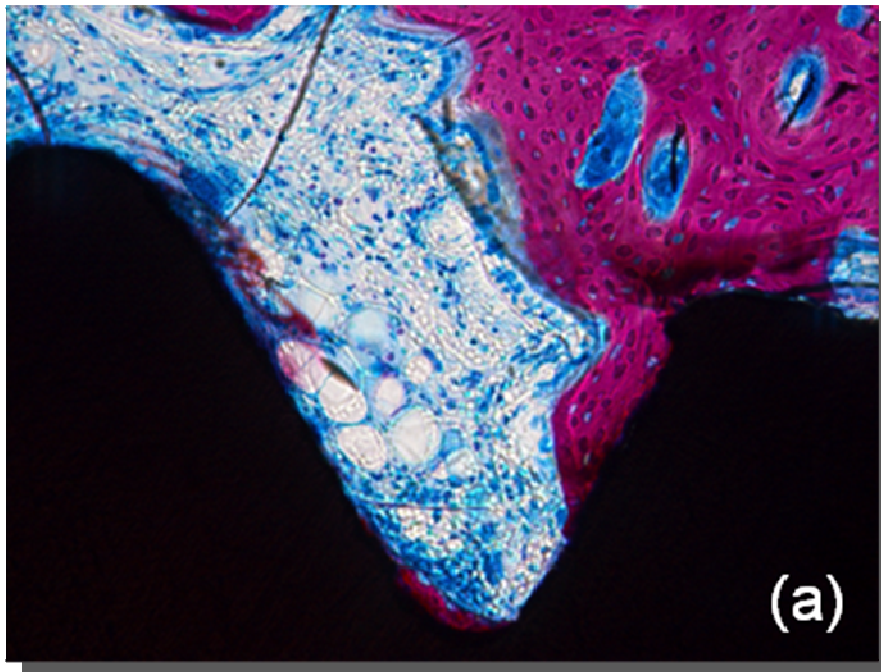
Period s (Week)	Evaluated Surfaces			<i>P value</i>
	MS	LMS	HA	
4	0.46 $\pm$ 1.21 ^A	3.15 $\pm$ 2.79 ^A	4.26 $\pm$ 3.76 ^A	(n/s)
8	3.29 $\pm$ 2.51 ^A	5.58 $\pm$ 2.73 ^A	5.01 $\pm$ 1.84 ^A	(n/s)
12	3.71 $\pm$ 5.50 ^A	4.66 $\pm$ 1.92 ^{AB}	6.61 $\pm$ 2.72 ^{BC}	(AC) < 0.05

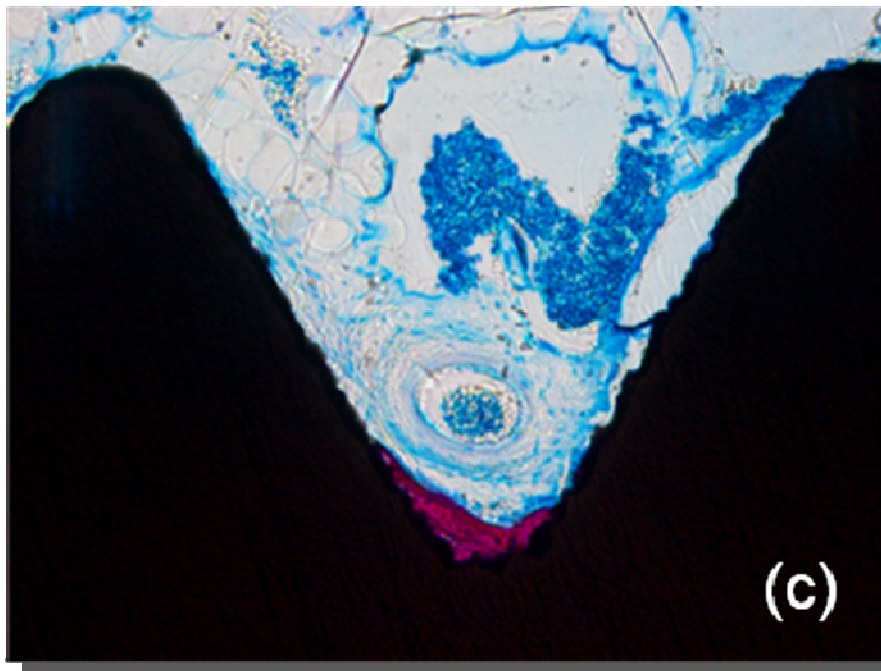
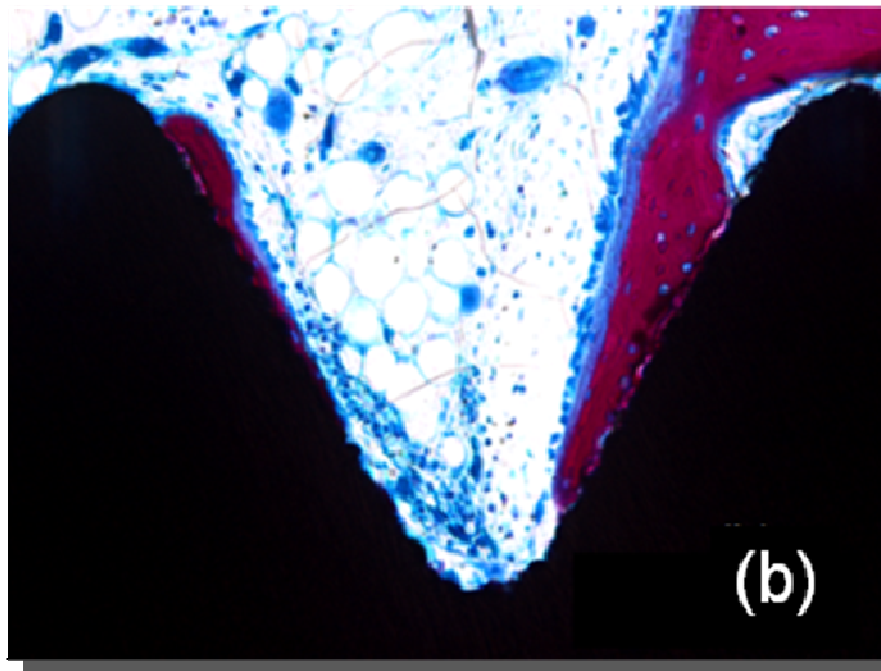
(A, B, C) different letters indicate the statistical difference at $P < 0.05$,

ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

Although the endosteal region is characterized by the absence of cancellous bone, most of the HA implants showed a spontaneous formation of a bone layer distant from the old bone with osteoblasts

activation by direct contact with the HA surface. This occurrence could also be observed for LMS implants especially in later periods. Unlike the HA implants, the bone formation in the endosteal region of the LMS and MS implants was restricted to the distance osteogenesis, with the bone formation by guided the implant surface, but originated from the basal bone. (Figure 6)





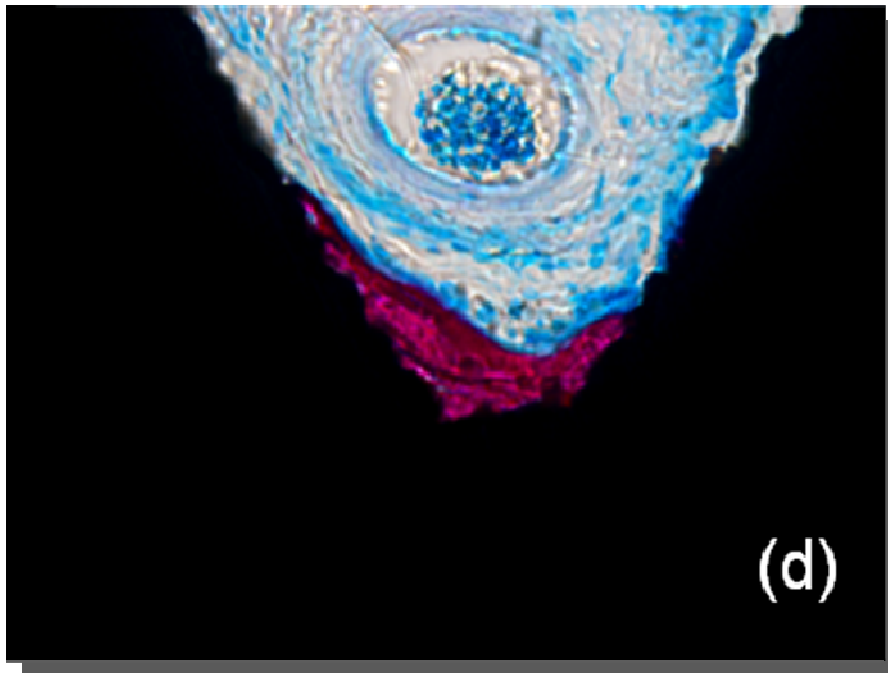


Figure 6. Histological ground section of the endosteal region at four weeks of healing, showing the ability of the surfaces to form bone in a region characterized by the absence of cancellous bone. (a) MS surface showing the bone formation from the pre-existing bone (original x 200 magnification), (b) LMS demonstrating the ability in fast conduct the neo bone formation, note the osteoblast line indicating continuous bone formation in close contact with the surface (original x 200 magnification). (c) Note the HA surface with bone formation distant from any point of pre-existing bone, indicating the osteoblasts activation by the direct contact with the surface and (d) the very close contact between bone and implant surface, suggesting contact osteogenesis (Stevenel's blue plus acid fuccin, original x 200 magnification).

4. DISUSSION

There are various methods for evaluating bone quality and osseointegration. Histomorphometric and removal torque measurements are two representative tests in studying the nature of the implant-tissue interface (30). Many authors used these combined methods, aiming to evaluate the bone-implant interface in a more secure and comprehensive aspect (6, 31-35).

In a previous investigation of our group (23), the same implants (MS, LMS and HA) were evaluated by removal torque tests at 4, 8 and 12 weeks of healing, and the results showed that LMS and HA were statistically superior to MS surfaces in all periods of evaluation. It also showed that HA was significantly superior to LMS after 4 and 8 weeks of healing. Based on these results, the authors conclude that the implants with laser surface modification associated with HA biomimetic coating could shorten the implant healing time (23). However, the bone-implant contact analysis in the present study showed that in the cortical region, the LMS and HA implants were statistically superior to MS for all periods of healing with no statistical differences between LMS and HA.

When compared in the endosteal region, the LMS and HA implants were statistically superior to MS at the initial periods of healing and, although the LMS and HA implants showed no statistical differences, a tendency of higher mean values for HA in the endosteal region was

observed for all periods of the study. This lack of statistical difference can be explained if we consider some aspects. From the statistical approach, one of them is related to the relative large standard deviation, which was expected if we consider that the endosteal region is characterized by the absence of cancellous bone, and that the histomorphometric analysis was performed including all the threads, even those with total absence of bone formation contributing to the obtained standard deviation.

From the biological point of view, the low correlation between the values of histomorphometric and removal torque analysis can be clarified by the difference in the degree of bone tissue maturation in contact with the surface of the implants, which directly influences the resistance to removal torque (36). Finding the same BIC for the LMS and HA does not necessarily indicate that these implants were integrated with the same mechanical strength to the bone. The characteristic of interfacial immature bone tissue may, in fact, indicate a decrease in strength implant anchorage than could be expected from the BIC percentage alone (36). The findings in the study by Carlsson et al. (1988)(37) may support this hypothesis. Carlsson and co-workers found a significantly stronger removal torque of their turned implants compared with polished ones, but were unable to show any reliable differences in histomorphometrically evaluated bone percentage(37). Indeed, primitive forms of bone can be observed irrespective of the implant surface at early healing time(36). However, bone tissue developments do not follow the same pattern in

different implant surfaces (36, 38, 39), reflecting directly on the values of removal torque.

Another factor to be considered when interpreting the results refers to the process involving the CaP coated implants and bone tissue integration. Plasma-spray has been the usual technique for the coatings deposition, showing to have a good bone response. However, there is concern about their mechanical and chemical integrity, partly because of their low adherence to the substrate, high thickness, low density, phase compositions that may not be controllable during the deposition process, and worrying success rate regarding long term stability (40-42). The absence of any chemical link between the plasma-sprayed hydroxyapatite and the titanium substrate leads to a limited adhesion between the coating and the implant (42). With the intention to create a chemical link between CaP coating and the Ti surface, the present study used the laser treatment to chemically prepare the surface. The laser treatment process was described by other authors who demonstrated good results *in vivo* studies (10, 12, 22, 23).

The laser beam increases the titanium surface temperature to the melting point followed by a fast cooling, resulting in standard roughness microstructures and a thick titanium oxide layer. The TiO_2 formed on this Ti cp surface is known to have the ability to improve the apatite bonding strength due to the high chemical affinity between TiO_2 and HA (43).

When exposed to SBF, OH-groups are adsorbed by the titanium ions in the oxide layer (24). The TiO_2 suffer a deprotonization and negative Ti–O groups are formed. These negative sites attract Ca_2^+ ions from the body fluid that bond to the surface (24). A layer of amorphous calcium titanate is then formed and the surface becomes slightly positively charged as the layer grows due to the Ca_2^+ ions. It will then attract negatively charged phosphate ions, which bond to the surface, and a metastable phase of calcium phosphate is then formed. This layer is then crystallized into bone-like hydroxyapatite because it is thermodynamically more favorable for the amorphous calcium phosphate to adopt a crystalline structure in a wet environment (24, 25).

This rough surface coated by the HA layer may act by encouraging bony ingrowths into its porous structure, providing a mechanical fixation beyond the bone chemical bonding of the implant to the surrounding bone (40, 41). The stability of this interface was demonstrated in a previous study through the MEV analysis of the retrieved HA implants. This demonstrated that even after a higher removal torque forces, occurred the fracture of the surrounding bone and not the bone-implant or implant-coating interfaces (23). In fact, these finding supports the hypothesis that, even with similar BIC, the LMS and HA implants have distinct implant-bone interface and bond strength characteristics.

The differences between the surfaces were also observed by the pattern of bone formation in the endosteal region at initial periods. Despite

being a region characterized by the absence of cancellous bone, much of the HA implants showed the spontaneous formation of a bone layer distant from the old bone with osteoblasts activation, by direct contact with the HA surface, suggesting contact osteogenesis (44). This occurrence could also be observed for LMS implants being more evident in later periods. Moreover, woven bone with lining osteoblasts was also found on the three surfaces at a certain distance from the old bone, or distance osteogenesis (44).

In conclusion, our findings suggest that histomorphometrical analyses should be combined with removal torque analysis and other qualitative methods for considering not only the degree of osseointegration, but also the quality of the bone-implant interface.

CONCLUSION

Within the limitations of the present study, the histomorphometric analysis indicate that the BIC and BBT values alone did not present significant differences in the cortical and endosteal region, but when evaluated with the results obtained in previous studies, the data suggest that the HA implants induce the contact osteogenesis and allow the formation of a more stable bone-implant interface, especially in earlier periods. Bone response to LMS was in accordance with the literature results, besides proving to be a very useful method of titanium surface

treatment. These methods of titanium surface bioactivity modification should be considered with great clinical applicability in dentistry and orthopedics, considering the low costs and viability to large-scale production. Further studies need to be done to demonstrate the behavior of these implant surfaces in terms of osseointegration under different loading conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors greatly appreciated the clinical support of Dr. Rafael Sartori, Hewerson Tavares dos Santos and Juliana Morais and the assistance of AS Technology and Aditek-Brazil.

REFERENCES

1. Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. Clin Oral Implants Res 2009 Sep;20 Suppl 4:185-206.
2. Gotfredsen K, Berglundh T, Lindhe J. Bone reactions adjacent to titanium implants subjected to static load of different duration. A study in the dog (III). Clin Oral Implants Res 2001 Dec;12(6):552-8.

3. Ledermann PD, Schenk RK, Buser D. Long-lasting osseointegration of immediately loaded, bar-connected TPS screws after 12 years of function: a histologic case report of a 95-year-old patient. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998 Dec;18(6):552-63.
4. Gottfredsen K, Wennerberg A, Johansson C, Skovgaard LT, Hjorting-Hansen E. Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: an experimental study with rabbits. *J Biomed Mater Res* 1995 Oct;29(10):1223-31.
5. Torensma R, ter Brugge PJ, Jansen JA, Figdor CG. Ceramic hydroxyapatite coating on titanium implants drives selective bone marrow stromal cell adhesion. *Clin Oral Implants Res* 2003 Oct;14(5):569-77.
6. Klokkevold PR, Nishimura RD, Adachi M, Caputo A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res* 1997 Dec;8(6):442-7.
7. Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, Rao W, Testori T, Porter SS. 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.
8. Buser D, Mericske-Stern R, Bernard JP, Behneke A, Behneke N, Hirt HP, et al. Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clin Oral Implants Res* 1997 Jun;8(3):161-72.

9. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*1991 Jul;25(7):889-902.
10. Cho SA, Jung SK. A removal torque of the laser-treated titanium implants in rabbit tibia. *Biomaterials*2003 Nov;24(26):4859-63.
11. Gaggl A, Schultes G, Muller WD, Karcher H. Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces--a comparative study. *Biomaterials*2000 May;21(10):1067-73.
12. Hallgren C, Reimers H, Chakarov D, Gold J, Wennerberg A. An in vivo study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. *Biomaterials*2003 Feb;24(5):701-10.
13. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont*2004 Sep-Oct;17(5):536-43.
14. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont*2004 Sep-Oct;17(5):544-64.
15. Park YS, Yi KY, Lee IS, Han CH, Jung YC. The effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the grit-blasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants*2005 Jan-Feb;20(1):31-8.

16. Sun L, Berndt CC, Gross KA, Kucuk A. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review. *J Biomed Mater Res* 2001;58(5):570-92.
17. Lee JJ, Rouhfar L, Beirne OR. Survival of hydroxyapatite-coated implants: a meta-analytic review. *J Oral Maxillofac Surg* 2000 Dec;58(12):1372-9; discussion 9-80.
18. Sun JS, Lin FH, Hung TY, Tsuang YH, Chang WH, Liu HC. The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities. *J Biomed Mater Res* 1999 Jun 15;45(4):311-21.
19. Orsini G, Piattelli M, Scarano A, Petrone G, Kenealy J, Piattelli A, et al. Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *J Periodontol* 2007 Feb;78(2):209-18.
20. Lacefield WR. Current status of ceramic coatings for dental implants. *Implant Dent* 1998;7(4):315-22.
21. Ong JL, Carnes DL, Bessho K. Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. *Biomaterials* 2004 Aug;25(19):4601-6.
22. 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 Apr-Jun;23(2):137-43.

23. Faeda RS, Tavares HS, Sartori R, Guastaldi AC, Marcantonio E, Jr. Biological performance of chemical hydroxyapatite coating associated with implant surface modification by laser beam: biomechanical study in rabbit tibias. *J Oral Maxillofac Surg* 2009 Aug;67(8):1706-15.
24. Svetina M, Colombi Ciacchi L, Sbaizero O M, S. , De Vita A. Deposition of calcium ions on rutile (110): A first-principles investigation. *Acta Materialia* 2002;49(12):2169-77.
25. Forsgren J, Svahn F, Jarmar T, Engqvist H. Formation and adhesion of biomimetic hydroxyapatite deposited on titanium substrates. *Acta Biomater* 2007 Nov;3(6):980-4.
26. Braga FJC, Marques RFC, Filho EA, Guastaldi AC. Surface modification of Ti dental implants by Nd:YVO₄ laser irradiation. *Applied Surface Science* 2007;253(23):9203-8
27. Moritz N, Jokinen M, Peltola T, Areva S, Yli-Urpo A. Local induction of calcium phosphate formation on TiO₂ coatings on titanium via surface treatment with a CO₂ laser. *J Biomed Mater Res A* 2003 Apr 1;65(1):9-16.
28. Kokubo T, Ito S, Huang ZT, Hayashi T, Sakka S, Kitsugi T, et al. Ca,P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res* 1990 Mar;24(3):331-43.
29. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982 Aug;11(4):318-26.

30. Meredith N. Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *Int J Prosthodont* 1998 Sep-Oct;11(5):491-501.
31. Wennerberg A, Albrektsson T, Lausmaa J. Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25- and 75-microns-sized particles of Al₂O₃. *J Biomed Mater Res* 1996 Feb;30(2):251-60.
32. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implants Res* 1995 Mar;6(1):24-30.
33. Larsson C, Thomsen P, Aronsson BO, Rodahl M, Lausmaa J, Kasemo B, et al. Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. *Biomaterials* 1996 Mar;17(6):605-16.
34. Sul YT, Johansson C, Wennerberg A, Cho LR, Chang BS, Albrektsson T. Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005 May-Jun;20(3):349-59.
35. Sul YT, Johansson CB, Albrektsson T. Oxidized titanium screws coated with calcium ions and their performance in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002 Sep-Oct;17(5):625-34.

36. Meirelles L, Arvidsson A, Albrektsson T, Wennerberg A. Increased bone formation to unstable nano rough titanium implants. Clin Oral Implants Res 2007 Jun;18(3):326-32.
37. Carlsson L, Rostlund T, Albrektsson B, Albrektsson T. Removal torques for polished and rough titanium implants. Int J Oral Maxillofac Implants 1988 Spring;3(1):21-4.
38. Rubo de Rezende M, Johansson C. Quantitative bone tissue response to commercially pure titanium implants. Journal of Material Science Medicine 1993;4(3-4):233-9.
39. Sennerby L, Thomsen P, Ericson L. Early tissue response to titanium implants inserted in rabbit cortical bone. Journal of Material Science Medicine 1993;4:240-50.
40. Block MS, Gardiner D, Kent JN, Misiek DJ, Finger IM, Guerra L. Hydroxyapatite-coated cylindrical implants in the posterior mandible: 10-year observations. Int J Oral Maxillofac Implants 1996 Sep-Oct;11(5):626-33.
41. McGlumphy EA, Peterson LJ, Larsen PE, Jeffcoat MK. Prospective study of 429 hydroxyapatite-coated cylindric omniloc implants placed in 121 patients. Int J Oral Maxillofac Implants 2003 Jan-Feb;18(1):82-92.
42. Nogueras-Bayona J, Gil FJ, Salsench J, Martinez-Gomis J. Roughness and bonding strength of bioactive apatite layer on dental implants. Implant Dent 2004 Jun;13(2):185-9.

43. Kim HW, Koh YH, Li LH, Lee S, Kim HE. Hydroxyapatite coating on titanium substrate with titania buffer layer processed by sol-gel method. *Biomaterials* 2004 Jun;25(13):2533-8.
44. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 2003 Aug;67(8):932-49.

6 DISCUSSÃO

Para a realização do presente estudo, partimos da escolha de um modelo animal (coelho) utilizado em pesquisas anteriores de implantes que, pelo seu porte, pudesse se constituir num modelo experimental capaz de receber implantes de comprimento e diâmetro compatíveis com os de uso clínico, procedimento também adotado por Sennerby et al.⁴³ Johansson e Albrektsson²⁰, Rezende⁴⁰, Margonar et al.³⁰ e Sakakura et al.⁴¹.

Vários autores têm descrito que independentemente de um determinado método de modificação da superfície ter o objetivo de alterar a macro, micro ou nano-rugosidade, alterações na química da superfície também ocorrem, o que acaba dificultando identificar qual o principal fator responsável pelos resultados quando comparamos implantes com diferentes tipos de tratamento de superfície^{21,55}. Da mesma forma, a comparação entre implantes de diferentes marcas e design, pelo teste de torque reverso, impossibilita identificar se a diferença entre os resultados obtidos referem-se à macro-estrutura ou à superfície do implante.

Buscando reduzir ao máximo as variáveis relacionadas às características do implante, utilizamos implantes da mesma marca, tamanho e **design** conforme sugerido por Rocci et al. (2003)³⁹. Em relação às propriedades físico-químicas da superfície, no presente estudo, os implantes recobertos por HA biomimética tiveram o preparo por laser

idêntico ao do grupo LMS, conforme sugerido por Szmukler-Moncler et al. (2004)⁴⁹. Os aspectos morfológicos e de rugosidade das superfícies HA e LMS, observados por MEV e pelo teste de rugosidade, demonstraram que não existiam diferenças significantes entre as topografias das superfícies testes. Por outro lado, a análise química por EDS, revelou que estas superfícies apresentam propriedades químicas bastantes distintas (Artigo 3 – Tabela1).

Diferentes metodologias podem ser utilizadas para avaliar a qualidade óssea peri-implantar e o grau de osseointegração de implantes de titânio. A análise histomorfométrica e de torque de remoção, são as metodologias mais utilizadas na avaliação da interface osso implante³³. Diversos autores utilizam essas metodologias combinadas, em busca de maior precisão e fidelidade na análise dos resultados obtidos^{24,28,44-45,53-54}.

A remoção de implantes por torque reverso foi introduzida inicialmente para a mensuração da força necessária para romper a interface osso/implante em implantes de superfície usinada¹¹. A principal vantagem desse método, reside na capacidade de extrair informação sobre a qualidade da osseointegração, expressa pela resistência mecânica da interface osso-implante, de uma maneira tridimensional, ou seja, referente a toda a superfície do implante.

A aferição do torque de remoção para diferentes tipos de superfícies de implantes permite a comparação do comportamento ósseo frente a diferentes topografias e potencial de bioatividade destas²⁵,

estando diretamente relacionados ao contato osso/implante, à densidade óssea e ao grau de embricamento entre a topografia da superfície e o tecido ósseo neo-formado, como observado por Sennerby et al.⁴³, Johansson, Albrektsson²⁰, Rezende⁴⁰ e Gotfredsen et al.¹⁷.

Apesar de fornecer informações importantes sobre qualidade da interface osso implante, essa metodologia de análise destrói o tecido ósseo em contato com a superfície do implante, não permitindo a utilização dessas amostras para análise dos eventos celulares envolvidos nas diferentes fases do processo de osseointegração, bem como a análise qualitativa do tecido ósseo neoformado.

Com isso, faz-se necessário e de maneira insubstituível, a instalação de implantes para a análise histomorfométrica, da interface osso-implante. Conforme definição de Branemark⁷ (1985), a osseointegração pode ser definida como sendo “o contato direto e estrutural, entre osso vivo e organizado e a superfície de um implante em função analisado por microscopia óptica”. A análise histomorfométrica possibilita a avaliação da proximidade e afinidade das células osteoprogenitoras com a superfície, o grau de maturação e organização do tecido ósseo em contato, do padrão de osteogênese (à distância ou de contato), do comportamento do implante nos diferentes tipos ósseos (cortical e medular) e da integridade da superfície do implante. No entanto, apesar de ser uma metodologia rica em informações, ela é representativa de uma pequena fatia do implante de aproximadamente

50µm de espessura, sendo obtido geralmente, não mais do que 2 secções por implante.

Sendo assim, é recomendável que se faça a combinação de diferentes metodologias (torque de remoção, histomorfometria, microscopia eletrônica de varredura e transmissão, análise radiográfica, microtomografia, análises biomoleculares, descritivas, etc) para se chegar a uma conclusão sobre a real resposta do tecido ósseo em relação à superfície de implante estudada.

No presente estudo, foi realizada a análise por torque de remoção seguida da microscopia eletrônica de varredura dos implantes removidos (dados apresentados nos artigos 1 e 2) e a avaliação histomorfométrica do contato osso-implante e da área óssea entre espiras (artigo 3).

A partir dos resultados obtidos pelo teste de torque reverso, pôde-se observar a superioridade estatística dos implantes recobertos por HA biomimética em relação às demais superfícies principalmente nos períodos iniciais de cicatrização (4 e 8 semanas), com aceleração e intensificação da resistência ao contra-torque da interface osso/implante provavelmente pela ação bioativa do recobrimento. A superfície LMS, apesar de apresentar resultado inferior à HA, foi estatisticamente superior à superfície usinada nos três períodos de avaliação, demonstrando sua eficiência quanto à osseointegração. Os implantes MS, obtiveram resultados inferiores aos demais, compatível com padrão de ancoragem

exclusivamente tempo dependente, diferentemente das outras superfícies avaliadas.

Por outro lado, a análise do contato osso-implante mostrou que na região cortical, os implantes LMS e HA foram estatisticamente superiores ao MS para todos os períodos de cicatrização, sem diferença estatística entre LMS e HA.

Quando comparados na região endosteal, os implantes LMS e HA foram estatisticamente superiores ao MS no período inicial de cicatrização. Embora os implantes LMS e HA não apresentassem diferenças estatísticas entre eles, uma tendência de maiores valores de BIC% para HA na região endosteal foi observada em todos os períodos do estudo. Esta falta de diferença estatística pode ser compreendida se levarmos em conta o alto desvio padrão obtido, o que era esperado, se considerarmos que a região endosteal é caracterizada pela ausência de osso esponjoso, e a análise histomorfométrica foi realizada, incluindo todas as espiras, mesmo aquelas com total ausência de formação óssea, contribuindo para o desvio padrão obtido.

Do ponto de vista biológico, a baixa correlação entre os valores da análise histomorfométrica e de torque de remoção pode estar relacionada ao grau de maturação do tecido ósseo em contato com a superfície dos implantes, o que influencia diretamente a resistência ao torque de remoção³². O fato de encontrar o mesmo BIC, como aconteceu no caso dos implantes LMS e HA, não indica necessariamente que estes

implantes são integrados com a mesma resistência mecânica do osso. A própria natureza do tecido ósseo interfacial imaturo pode, de fato, indicar ancoragem óssea mais fraca do que esperado a partir da percentagem BIC por si só³². Os resultados encontrados por Carlsson et al.¹¹ (1988) suportam esta hipótese. Carlsson e colaboradores encontraram um torque de remoção significativamente maior para implantes usinados quando comparados a implantes polidos, no entanto foram incapazes de demonstrar diferenças significativas na análise histomorfométrica do tecido ósseo¹¹. Na verdade, tecido ósseo imaturo pode ser observado independentemente da superfície do implante nos períodos iniciais de cicatrização³². No entanto, o desenvolvimento do tecido ósseo não segue o mesmo padrão em diferentes superfícies de implantes^{32,40,42} refletindo diretamente sobre os valores de torque de remoção.

Outro fator a ser considerado na interpretação dos resultados, refere-se ao processo de integração dos implantes revestidos CaP ao tecido ósseo. O plasma-spray tem sido a técnica mais utilizada para a deposição do revestimento, mostrando ter uma excelente integração ao tecido ósseo. No entanto, sua integridade mecânica e química gera preocupações, em parte devido à baixa aderência ao substrato de titânio, grande espessura, baixa densidade, e composições das fases da HA que não podem ser controlados durante o processo de deposição, tornando pouco previsível sua estabilidade a longo prazo^{5,31,35,43}. A ausência de qualquer ligação química entre o plasma-spray de hidroxiapatita e o

substrato de titânio leva a uma adesão limitada entre o revestimento e o implante³⁵. Com a intenção de criar uma ligação química entre o revestimento de CaP e a superfície de Ti, o presente estudo utilizou o tratamento com laser para preparar quimicamente a superfície. O processo de tratamento com laser foi descrito por outros autores que demonstraram bons resultados em estudos *in vivo*.^{12,18}

O feixe de laser aumenta a temperatura da superfície do titânio até o ponto de fusão seguido de um rápido resfriamento, resultando em uma topografia com rugosidade padronizada e espessa camada de óxido de titânio. O TiO₂ formado sobre essa superfície Ti cp é conhecido por ter a capacidade de melhorar a resistência de união do recobrimento, devido à alta afinidade química entre TiO₂ e HA²³.

Quando expostos a SBF, grupos-OH são absorvidos pelos íons de titânio na camada de óxido⁴⁸. O TiO₂ sofre um desprotonização e grupos negativo Ti-O são formados. Estes sítios negativos atraem íons Ca²⁺ do fluido corpóreo que aderem à superfície⁴⁸. Uma camada de titanato de cálcio amorfo é formada e, em seguida, a superfície torna-se aos poucos carregada positivamente conforme cresce devido aos íons Ca²⁺. Isso fará com que íons fosfatos, carregados negativamente, sejam atraídos, aderindo-se à superfície, e uma fase metastática de fosfato de cálcio seja formada. Essa camada é, então, cristalizada em hidroxiapatita semelhante à óssea, por ser termodinamicamente mais favorável para o

fosfato de cálcio amorfo a adotar uma estrutura cristalina em um ambiente aquoso^{15,48}.

Esta superfície rugosa revestida pela camada de HA pode atuar incentivando o crescimento ósseo para o interior das porosidades, proporcionando uma fixação mecânica além da ligação química entre o implante e o tecido ósseo^{5,31}. A estabilidade desta interface foi descrita pelos artigos 1 e 2 através da análise de MEV dos implantes HA removidos pelo teste de torque reverso, sendo demonstrado que, mesmo depois de ter os maiores valores de torque de remoção, ocorreu a fratura do osso circundante e não da interface osso-implante ou implante – revestimento. Na verdade, esse achado corrobora a hipótese de que, mesmo com BIC semelhante, ao implantes LMS e HA têm diferentes interfaces osso-implante e força de adesão ao tecido ósseo.

As diferenças entre as superfícies também foram observados em padrão de formação óssea na região endosteal nos períodos iniciais. Apesar de ser uma região caracterizada pela ausência de osso esponjoso, grande parte dos implantes HA apresentaram formação espontânea de uma camada óssea distante do osso basal, com ativação de osteoblastos por contato direto com a superfície de HA, sugerindo osteogênese de contato¹³. Esta ocorrência também pode ser observada para os implantes LMS sendo evidente em períodos mais tardios. Além disso, tecido ósseo em formação com osteoblastos alinhados também foi

encontrada nas três superfícies a uma certa distância do osso basal, ou osteogênese a distância¹³.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, frente à metodologia empregada permitiram concluir que:

- 1- os implantes de superfície usinada apresentaram resultados inferiores aos das demais superfícies avaliadas, com padrão de formação óssea tempo dependente;
- 2- os implantes modificados por Laser apresentaram resultados superiores aos usinados nos períodos iniciais, demonstrando grande potencial osseocondutor sugerindo uma osseointegração mais rápida;
- 3- os implantes revestidos por HA foram superiores nos períodos iniciais a todas as outras superfícies testadas, principalmente quanto à retenção ao tecido ósseo;
- 4- apesar de não haver diferença estatística quanto ao BIC% dos implantes LMS e HA, os resultados histométricos da região endosteal, sugerem a existência de diferenças nas características do tecido ósseo em contato com os implantes HA e no mecanismo de adesão osso-implante;
- 5- Estudos clínicos em osso tipo IV são necessários para um melhor entendimento no que se refere à estabilidade a longo prazo bem como do comportamento das superfícies testadas quando expostas ao biofilme do meio bucal, e submetidas a carregamento.

8 REFERÊNCIAS*

1. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont.* 2004;17:536-43.
2. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont.* 2004;17:544-64.
3. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 1981;52:155-70.
4. Berglundh T, Abrahamsson I, Lindhe J. Bone reactions to longstanding functional load at implants: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2005;32:925-32.
5. Block MS, Gardiner D, Kent JN, Misiek DJ, Finger IM, Guerra L. Hydroxyapatite-coated cylindrical implants in the posterior mandible: 10-year observations. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996;11:626-33.
6. Braga FJC, Marques RFC, Almeida Filho E, Guastaldi AC. Surface modification of Ti dental implants by Nd:YVO4 laser irradiation. *Appl Surf Sci* 2007;25323: 9203–8.

*De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site:

http://www.nlm.nih.gov/bsd/unifom_requirements.html

7. Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent*. 1983;50:399-410.
8. Brunette DM, Chehroudi B. The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. *J Biomech Eng*. 1999;121:49-57.
9. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1991;25:889-902.
10. Buser D, Mericske-Stern R, Bernard JP, Behneke A, Behneke N, Hirt HP, et al. Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clin Oral Implants Res*. 1997;8:161-72.
11. Carlsson L, Rostlund T, Albrektsson B, Albrektsson T. Removal torques for polished and rough titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1988;3:21-4.
12. Cho SA, Jung SK. A removal torque of the laser-treated titanium implants in rabbit tibia. *Biomaterials*. 2003;24(26):4859-63.
13. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ*. 2003;67:932-49.
14. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol*. 1982;11:318-26.

15. Forsgren J, Svahn F, Jarmar T, Engqvist H. Formation and adhesion of biomimetic hydroxyapatite deposited on titanium substrates. *Acta Biomater*. 2007;3:980-4.
16. Gaggl A, Schultes G, Muller WD, Karcher H. Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces--a comparative study. *Biomaterials*. 2000;21:1067-73.
17. Gotfredsen K, Berglundh T, Lindhe J. Bone reactions adjacent to titanium implants subjected to static load of different duration. A study in the dog (III). *Clin Oral Implants Res*. 2001;12:552-8.
18. Hallgren C, Reimers H, Chakarov D, Gold J, Wennerberg A. An in vivo study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. *Biomaterials*. 2003;24:701-10.
19. Ivanoff CJ, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO(2) blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12:128-34.
20. Johansson C, Albrektsson T. Integration of screw implants in the rabbit: a 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1987;2:69-75.
21. Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(Suppl 4):185-206.

22. Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996;7:329-45.
23. Kim HW, Koh YH, Li LH, Lee S, Kim HE. Hydroxyapatite coating on titanium substrate with titania buffer layer processed by sol-gel method. *Biomaterials.* 2004;25(13):2533-8.
24. Klokkevold PR, Nishimura RD, Adachi M, Caputo A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8:442-7.
25. Kokubo T, Kushitani H, Ebisawa Y. Apatite formation on bioactive ceramics in body environment. In: Oonishi H, Aoki H, Sawai K, eds. *In: Bioceramics, Vol. 1.* Tokyo: Ishiyaku EuroAmerica; 1989. p. 157-62.
26. Kokubo T, Ito S, Huang ZT, Hayashi T, Sakka S, Kitsugi T, et al. Ca,P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res.* 1990;24:331-43.
27. Lacefield WR. Current status of ceramic coatings for dental implants. *Implant Dent.* 1998;7:315-22.

28. Larsson C, Thomsen P, Aronsson BO, Rodahl M, Lausmaa J, Kasemo B, et al. Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. *Biomaterials*. 1996;17:605-16.
29. Ledermann PD, Schenk RK, Buser D. Long-lasting osseointegration of immediately loaded, bar-connected TPS screws after 12 years of function: a histologic case report of a 95-year-old patient. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1998;18:552-63.
30. Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M, Pepato MT, Alba RC, Marcantonio E. The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. *Implant Dent*. 2003;12:333-9.
31. McGlumphy EA, Peterson LJ, Larsen PE, Jeffcoat MK. Prospective study of 429 hydroxyapatite-coated cylindric omniloc implants placed in 121 patients. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18:82-92.
32. Meirelles L, Arvidsson A, Albrektsson T, Wennerberg A. Increased bone formation to unstable nano rough titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18:326-32.

33. Meredith N. Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *Int J Prosthodont*. 1998;11:491-501.
34. Moritz N, Jokinen M, Peltola T, Areva S, Yli-Urpo A. Local induction of calcium phosphate formation on TiO₂ coatings on titanium via surface treatment with a CO₂ laser. *J Biomed Mater Res A*. 2003;65:9-16.
35. Noguerras-Bayona J, Gil FJ, Salsench J, Martinez-Gomis J. Roughness and bonding strength of bioactive apatite layer on dental implants. *Implant Dent*. 2004;13:185-9.
36. Ong JL, Carnes DL, Bessho K. Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. *Biomaterials*. 2004;25(19):4601-6.
37. Orsini G, Piattelli M, Scarano A, Petrone G, Kenealy J, Piattelli A, et al. Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *J Periodontol*. 2007;78:209-18.
38. Park YS, Yi KY, Lee IS, Han CH, Jung YC. The effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the grit-blasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20:31-8.

39. Rocci A, Martignoni M, Gottlow J. Immediate loading of Branemark System TiUnite and machined-surface implants in the posterior mandible: a randomized open-ended clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2003;5(Suppl 1):57-63.
40. Rubo de Rezende M, Johansson C. Quantitative bone tissue response to commercially pure titanium implants. *J Mater Sci Mater Med* 1993;4:233-9.
41. Sakakura CE, Margonar R, Holzhausen M, Nociti FH Jr., Alba RC Jr., Marcantonio E Jr. Influence of cyclosporin A therapy on bone healing around titanium implants: a histometric and biomechanic study in rabbits. *J Periodontol*. 2003;74:976-81.
42. Sennerby L, Thomsen P, Ericson L. Early tissue response to titanium implants inserted in rabbit cortical bone. *J Mater Sci Mater Med J Mater Sci Mater Med* 1993;4:240-50.
43. Sennerby L, Thomsen P, Ericson 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.
44. Sul YT, Johansson CB, Albrektsson T. Oxidized titanium screws coated with calcium ions and their performance in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17:625-34.

45. Sul YT, Johansson C, Wennerberg A, Cho LR, Chang BS, Albrektsson T. Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20:349-59.
46. Sun JS, Lin FH, Hung TY, Tsuang YH, Chang WH, Liu HC. The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities. *J Biomed Mater Res*. 1999;15;45:311-21.
47. Sun L, Berndt CC, Gross KA, Kucuk A. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review. *J Biomed Mater Res*. 2001;58:570-92.
48. Svetina M, Colombi Ciacchi L, Sbaizero O M S, De Vita A. Deposition of calcium ions on rutile (110): a first-principles investigation. *Acta Materialia*. 2002;49:2169-77.
49. Szmukler-Moncler S, Perrin D, Ahossi V, Magnin G, Bernard JP. Biological properties of acid etched titanium implants: effect of sandblasting on bone anchorage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004;68:149-59.
50. Torensma R, ter Brugge PJ, Jansen JA, Figdor CG. Ceramic hydroxyapatite coating on titanium implants drives selective bone marrow stromal cell adhesion. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14:569-77.

51. Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, Rao W, Testori T, Porter SS. Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. *J Periodontol.* 2003;74:945-56.
52. Veis AA, Trisi P, Papadimitriou S, Tsirlis AT, Parissis NA, Desiris AK, et al. Osseointegration of osseotite and machined titanium implants in autogenous bone graft. A histologic and histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15:54-61.
53. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(Suppl 4):172-84.
54. Wennerberg A, Albrektsson T, Lausmaa J. Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25- and 75-microns-sized particles of Al₂O₃. *J Biomed Mater Res.* 1996;30:251-60.
55. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implants Res.* 1995;6:24-30.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

FACULDADE DE ODONTOLOGIA



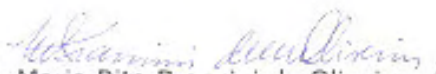
Araraquara, 13 de abril de 2005

Ofício CEEA-FO/Ar. nº 023/2005

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Experimentação Animal- CEEA da Faculdade de Odontologia de Araraquara reunido em 12/04/2005, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "AVALIAÇÃO DA OSSEOINTEGRAÇÃO EM DIFERENTES SUPERFÍCIES DE IMPLANTES. ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO E TESTE BIOMECÂNICO EM COELHOS" (Proc. CEEA nº. 02/2005) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a aprovação vinculada a apresentação do RELATÓRIO FINAL em MARÇO/2006.

Atenciosamente


Profª, Drª, Maria Rita Brancini de Oliveira
Coordenadora do CEEA

Ao
C.D. RAFAEL SILVEIRA FAEDA
DD. Pesquisador Responsável
PROF. DR. ELCIO MARCANTÔNIO JUNIOR
DD. Orientador
Nesta