



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

JÉSSICA FREITAS DE ANDRADE

**Avaliação dos efeitos de uma superfície de implante
revestida com fosfato de cálcio na resposta óssea.
Análise histométrica.**

Araçatuba - SP

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

JÉSSICA FREITAS DE ANDRADE

**Avaliação dos efeitos de uma superfície de implante
revestida com fosfato de cálcio na resposta óssea.
Análise histométrica.**

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

Orientador: Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior.

Araçatuba – SP

2015

Dedicatória

Dedico esse trabalho primeiramente a minha família que durante toda a minha vida me apoiou e me deu suporte para que eu pudesse traçar minhas escolhas e seguir meu caminho.

À todos os professores que tive durante minha trajetória escolar, pois tiveram paciência, me incentivaram e acreditaram em mim.

À minha amiga Janaina Dias, que sempre me ajudou e nos momentos que me senti fraca me deu forças para continuar durante os 5 anos de faculdade, superando comigo as dificuldades e me fazendo sempre acreditar que íamos conseguir.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA-UNESP, todo o corpo docente e funcionários, pois todos sempre muito dedicados e empenhados me ajudaram e devo grande parte da minha formação á eles.

Ao meu orientador Professor Adjunto Idelmo Rangel Garcia Junior, que sempre que pode mostrou se disponível a me ensinar, me incentivou á fazer pesquisa e sempre me apoiou tanto na atividade clínica como nos trabalhos de iniciação científica.

A Prof. Assist. Dra. Daniela Ponzoni que aceitou fazer parte da minha banca examinadora, e durante a graduação me incentivou a atividade clínica, me orientando em cursos e mostrando-se disponível a abrir portas dentro da disciplina de Cirurgia Bucomaxilofacial.

A Prof. Assist. Dra. Alessandra Marcondes Aranega, que foi minha orientadora no projeto CIRPAC e sempre me mostrou que temos de ser alem de profissionais de excelência, temos que ser profissionais humanos, que se preocupam com o próximo e fazem o que estiver ao seu alcance para ajudar.

Ao Professor Assistente Doutor Franscisley Avila Souza, que sempre esteve disponível para solucionar minhas duvidas e me incentivou tanto na pesquisa quanto na atividade clínica.

Aos técnicos de laboratório Paulo e Marcus e ao secretario do departamento Renato, agradeço por toda ajuda e dedicação.

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

A FAPESP, pelo apoio financeiro durante ta realização do projeto.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente á Deus, pois sempre me iluminou e abençoou permitindo que eu fizesse escolhas corretas e seguisse meu caminho sempre com sua proteção. Agradeço a ele também por ter me dado a oportunidade de conhecer pessoas tão especiais durante a graduação.

Aos meus pais Edmarcio de Andrade e Angela Maria Freitas de Andrade e aos meus irmãos Diego Freitas de Andrade e Guilherme Fretas de Andrade que sempre me apoiaram e me ensinaram que o amor e a união de uma família é fundamental na vida de qualquer pessoa, e que a distancia durante esses 5 anos de graduação só serviram para nos unir ainda mais.

Aos meus padrinhos Rosangela Barreto Takeshita e Alan Takeshita, sempre estiveram do meu lado, me orientando e apoiando nas escolhas que fiz.

Á Doutoranda Sabrina Ferreira, que me orientou e me ensinou a como realizar uma pesquisa de iniciação científica, sempre com muita dedicação, paciência e carinho.

Aos pos- graduandos Leonardo Faverani e Juliana Zorzi, sempre estavam dispostos a me ajudar e me ensinar, tanto na pesquisa como na clinica.

Á Janaina Dias, minha amiga de todos os momentos, me ajudou no projeto e nunca me deixou duvidar da minha capacidade.

A todos os meus amigos e amigas, pelo carinho, durante esses 5 anos, foram meus amigos que supriram a falta que senti da minha família.

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

“Pedras no caminho?

Eu guardo todas. Um dia vou construir um castelo.”

Nemo Nox

Resumo

ANDRADE, J.F. **Avaliação dos efeitos de uma superfície de implante revestida com fosfato de cálcio na resposta óssea. Análise histométrica.** 2015. 55 f. Trabalho de Conclusão de curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

Apesar dos excelentes resultados obtidos no protocolo desenvolvido em pacientes com boa qualidade e quantidade óssea, situações clínicas desfavoráveis, como áreas posteriores de maxila, áreas enxertadas, pacientes com alterações sistêmicas como diabetes, osteoporose e que apresentam pobre qualidade e quantidade óssea, podem influenciar o sucesso das reabilitações implantossuportadas. O objetivo deste estudo é avaliar a interface osso/implante após a instalação de implantes de titânio comercialmente puro (Ticp) com superfície usinada com e sem deposição de CaP pelo método semelhante ao biomimético em modelo padronizado em tíbia de rato, por meio de análise histométrica. Cento e vinte e oito implantes de titânio comercialmente puros com duas superfícies diferentes (superfície usinada e superfície modificada a base de fosfato de cálcio) foram instalados em tíbias de ratos. A eutanásia foi realizada aos 7, 15, 30 e 40 dias. A análise histológica nos períodos estudados mostrou que reparo ósseo periimplantar no grupo GFO com um aumento progressivo da corticalização na interface osso/implante em todas as espaços correspondentes as espiras dos implantes, no grupo GUS, foi possível observar um atraso no processo de reparo ósseo na região medular. Foi possível concluir que a superfície tratada com fosfato de cálcio conseguiu melhorar o reparo ósseo periimplantar nos implantes de titânio instalados em tíbias de ratos.

Palavras chave: Implante dentário, Cálcio, Titânio.

Abstract

ANDRADE, J.F. Evaluation of effects of a calcium phosphate – coated titanium surface on bone response. Histometric analysis. 2015. 55 f. Trabalho de Conclusão de curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

Despite the excellent results obtained in the protocol developed in patients with good bone quality and quantity, unfavorable clinical conditions, such as posterior areas of the maxilla, grafted areas, patients with systemic diseases such as diabetes, osteoporosis and who have poor bone quality and quantity, can influence the success of implant rehabilitation. The aim of this study is to evaluate the bone / implant interface after installation of commercially pure titanium implants (cpTi) with machined surface with and without deposition of CaP by the method similar to biomimetic in standardized model in rat tibia through histometric analysis . One hundred and twenty eight commercially pure titanium implants with two different surfaces (the machined surface and surface modified calcium phosphate-based) were installed in the rat tibia. Euthanasia was performed at 7, 15, 30 and 40 days. Histological analysis in the periods studied showed that bone repair periimplantar in GFO group with a progressive increase in corticalization the bone / implant interface in all the corresponding spaces the turns of the implants, the GUS group, we observed a delay in the bone repair process in medullary region. It was possible to conclude that the surface treated with calcium phosphate could improve peri-implant bone healing in titanium implants installed in the tibia of rats.

Key-words: dental implant. Calcio. Titanium

Listas e Sumário

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagens dos implantes antes do tratamento de superfície.

Figura 2: Água deionizada em agitação

Figura 3: Compostos usados para o preparo da solução de fluido corporal.

Figura 4: Valor do pH da solução de fluido corporal no phametro.

Figura 5: Banhos em H2O2.

Figura 6: Implantes imersos em SFC saturada com CaP.

Figura 7: Baseline da segunda e terceira etapa de modificação da superfície

Figura 8: Implantes no banho de água oxigenada

Figura 9: Delineamento experimental dos grupos do estudo

Figura 10: Tricotomia e antissepsia com PVP-I na metáfise tibial

Figura 11: Incisão linear na lateral da metáfise tibial

Figura 12: Após incisão e divulsão por planos, acesso à metáfise tibial.

Figura 13: Fresa de 1,4 mm de diâmetro posicionada para osteotomia.

Figura 14: Osteotomia - leito ósseo fresado para instalação de implante.

Figura 15: Implante sendo instalado com chave digital.

Figura 16: Implantes instalados sob vista superior (A) e lateral (B), respectivamente.

Figura 17: Processamento histológico

Figura 18: Imagens histológicas dos cortes em parafina após a remoção do implante do grupo GFO aos A: 7 dias; B: 15 dias, C: 30 dias e D: 40 dias, corados com HE, aumento de 125x.

Figura 19: Imagens histológicas dos cortes em parafina após a remoção do implante do grupo GUS aos A: 7 dias; B: 15 dias, C: 30 dias e D: 40 dias, corados com HE, aumento de 125x.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ticp:	Implante de Titânio Comercialmente Puro
CaP:	Fosfato de Cálcio
GC:	Grupo Controle
GFC:	Grupo Fosfato de Cálcio
HE:	Hematoxilina e Eosina
ELCOI:	Extensão Linear de contato osso – implante
AO:	Área de tecido ósseo
SFC:	Simulador de Fluido Corporal
SBF:	Body Fluid Simulator
pH:	potencial Hidrogeniônico
PVPI:	Polivinil Pirrolidona Iodo

LISTA DE FÓRMULAS QUÍMICAS

TiO_2 = Óxido de Titânio

Al_2O_3 = Óxido de Alumínio

NaCl = Cloreto de Sódio

NaHCO_3 = Bicarbonato de Sódio

KCl = Cloreto de Potássio

K_2HPO_4 = Fosfato de Potássio

Na_2SO_4 = Sulfato de Sódio

HCl = Ácido Clorídrico

$\text{CaC}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = Carbonato de Cálcio Dihidratado

$\text{MgCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ = Cloreto de Magnésio Monohidratado

$\text{NA}_2 (\text{CH}_2 \text{ OH})^3$ = Metóxido de Sódio

H_2O_2 = Peróxido de Hidrogênio

SUMÁRIO

Resumo.....	8
Abstract.....	10
I. Introdução.....	18
II. Objetivos.....	21
III. Hipótese.....	23
IV. Materiais e Métodos.....	26
1. Materiais.....	26
1.1. <i>Implantes</i>	26
2. Métodos.....	26
3. Delineamento Experimental.....	28
3.1. <i>Instalação de Implantes</i>	28
3.2. <i>Cuidados pós operatórios</i>	30
4. Eutanásia e Coleta do Material.....	30
5. Processamento laboratorial.....	30
6. Análise estatística.....	31
V. Resultados.....	32
1. Análise Histológica.....	33
2. ELCOI.....	33
VI. Discussão.....	34
VII. Conclusão.....	36
VIII. Referências.....	38

Introdução

I. Introdução

A utilização de implantes osseointegráveis na reabilitação de indivíduos parcial ou totalmente edêntulos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (Bergkivist et al., 2004; Coelho et al., 2008). No entanto, ainda existem situações desfavoráveis à instalação de implantes, como pacientes que não possuem boa qualidade e quantidade óssea, áreas posteriores de maxila, áreas enxertadas, pacientes com alterações sistêmicas como diabetes, osteoporose, tais situações clínicas influenciam o sucesso das reabilitações implantadas (Thomas, Cook, 1992).

A fim de minimizar as chances de insucesso são realizadas alterações nas superfícies dos implantes, a partir de mudanças topográficas e físico-químicas propostas para aumentar a porcentagem de contato osso-implante, principalmente em áreas de tecido ósseo de menor densidade, favorecendo as respostas biológicas em um período de regeneração menor e, conseqüentemente, promovendo o sucesso em longo prazo dos implantes osseointegráveis (Xavier et al., 2003; Buser et al., 1998; Gotfredsen, Berglundh, Lindhe, 2001).

Diferentes métodos estão sendo utilizados para o tratamento de superfície de implantes, como as técnicas de adição (recobertas por plasma spray de titânio – TPS e de HA, recobrimentos com HA e outros fosfatos de cálcio – CaP) (Gotfredsen, Berglundh, Lindhe, 2001; Lin et al., 2009), ou subtração (tratamentos com ácido, associados ou não ao jateamento com óxido de titânio – TiO_2 ou óxido de alumínio – Al_2O_3 e irradiação com laser) (Trisi et al., 2003; Braga et al., 2007).

Um aspecto importante da integração do implante de titânio é o aumento da atividade funcional das células osteoblásticas no contato entre tecido e o implante, sem qualquer interferência de tecido fibroso (Rani, Vinoth-Kumar, 2012).

Como objetivo de melhorar a osseointegração e de diminuir o tempo de cicatrização óssea estudos são realizados modificando a química de superfície, a composição e a topografia dos implantes de titânio com materiais biocompatíveis (Shah, Nilson, 2014; Xiaohua, Mei, 2013), assim como o CaP. Este é um mineral osteocondutor que acelera a formação de osso em volta do implante instalado, resultando em uma melhor integração osso-implante e melhorando a biocompatibilidade da superfície do implante (Nguyen, Duong, Moon, 2014; Calvert, Desai, Webster, 2014).

As características do osso são fatores determinantes para que ocorra ou não a integração do implante, pois a qualidade e as características estruturais microscópicas são quem determinam na capacidade do tecido ósseo de suportar a transmissão e distribuição das forças produzidas (Leung et al., 2001; Isidor, 2006; Tabata et al., 2011; Dan-Jae, Chien-Ping, 2011.). Materiais considerados minerais osteocondutores possuem a capacidade de melhorar a osseointegração, tanto em qualidade de integração quanto em tempo (Aparecida AH et al, 2009).

Objetivo

II. Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar a interface osso/implante após a instalação de implantes de titânio comercialmente puro (Ticp) com superfície usinada com e sem deposição de CaP pelo método semelhante ao biomimético em modelo padronizado em tibia de rato, por meio de análise histométrica.

Hipótese

III. Hipótese

A hipótese do presente estudo foi de que o processo de reparo (formação óssea) será melhor no grupo com superfície modificada a base de CaP em comparação ao grupo usinado, em todos os períodos de eutanásia (7, 15, 30 e 40 dias).

Material e Métodos

IV. Material e Métodos

I. Materiais

1.1. Implantes

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

A – Implante Ticp com superfície usinada – 32 unidades

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

2. Métodos

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

64 implantes de titânio Ticp foram preparados segundo um método similar ao biomimético de modificação de superfície. A primeira etapa foi o preparo da SBF seguindo a modificação da solução original de Aparecida (Queiroz, T. P., et al.2013; Aparecida H.A et al, 2009)¹ proposta inicialmente por Kokubo (Kokubo T, Takadama H.2006).

1ª ETAPA: Preparo do SBF:

Em um béquer foi adicionado 500 ml de água deionizada, e sob agitação foram acrescidos os seguintes compostos, respectivamente, aguardando sempre cada solubilização (Figura 2 e 3):

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

8. $\text{MgCl} \cdot \text{H}_2\text{O} - 0,305\text{g}$
9. $\text{Na}_2 (\text{CH}_2 \text{OH})^3 - 6,057\text{g}$

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

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

Nesta etapa realizou-se o ataque ácido da superfície do Tici com banhos em ácido nítrico, sulfúrico e clorídrico. Em seguida, imersão em 50 mL de solução de H_2O_2 10V (Figura 5) e levados para uma estufa, e lá permaneceram por um período de 24 horas à 60°C, para a ativação da superfície. Após a ativação, os implantes foram mantidos em estufa por um período de aproximadamente 7 horas à 60°C para secagem da superfície. Após estes procedimentos os implantes começaram a ser tratados com a SBF também por um período de 24 horas na solução em estufa à 37°C seguida de secagem em estufa à 37°C.

3ª ETAPA: Modificação da superfície com CaP

SBF numa proporção de 2 gramas de fosfato de cálcio para cada 10 ml de SBF foi preparado e para recobrimento total dos implantes foram utilizados 100 ml de solução para cada troca (Figura 6). A mistura foi feita através de um agitador magnético. A imersão dos implantes nessa solução ocorreu por um período de 72 horas em estufa à 37°C, com trocas diárias da solução para manter o equilíbrio dos íons. A ultima troca foi realizada com álcool absoluto mais CaP na mesma concentração e tempo da utilizada na SBF. Após este período foram deixados em estufa a 60°C até secagem total da superfície (figura 7).

4ª ETAPA: Limpeza da superfície e esterilização

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

- Água oxigenada (H_2O_2) 10 volumes (Figura 8);
- Solução salina fisiológica 0,9%;

- E álcool absoluto.

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

3. Delineamento Experimental

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

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FOA-UNESP sob protocolo 005276 2/2 (Anexo1). Os mesmos animais serão enquadrados em dois grupos experimentais (Figura 9):

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

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

3.1 Instalação dos implantes

Um estudo piloto foi realizado utilizando 3 espécimes com objetivo de calibrar o operador para posterior cirurgia dos demais animais. Após jejum pré-operatório de 8 horas os

animais foram anestesiados por sedação através de administração via intramuscular de cloridrato de ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil), na dosagem de 10mg/Kg, e de cloridrato de xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5mg/Kg. Foi realizada em complementação anestésica a infiltração local de solução de cloridrato de mepivacaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre 100®, DFL LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) na dosagem de 0,3 ml/Kg na metáfise tibial.

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

A tibia então foi acessada com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15C (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão), montada em cabo de bisturi número 3 (Hu-Friedy®, German). Uma incisão linear por planos anatômicos de 3 cm foi realizada na região lateral da metáfise tibial e a pele e o periósteo foram descolados e devidamente afastados com um descolador tipo Molt (Hu-Friedy®, German), o suficiente para haver exposição da porção lateral da metáfase tibial (Figura 11 e 12).

Após exposição do tecido ósseo foi realizado osteotomiabi-cortical com fresa do tipo lança de 1,4 mm de diâmetro montada em contra-ângulo redutor de 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinville, Brasil), que por sua vez estava conectado a um motor elétrico de rotação controlada (modelo BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1500 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) (Figura 13 e 14). Cada animal recebeu 2 implantes de titânio com travamento e estabilidade inicial, cada um de 1,6 mm de diâmetro e 3,0 mm de altura (Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brasil), sendo 1 em cada metáfise tibial. Na tibia direita foi instalado um implante de 1,6 x 3,0 mm com superfície modificada à base de CaP e na tibia esquerda um implante de 1,6 x 3,0 mm com superfície usinada (Figura 15).

Após a instalação dos implantes (Figura 16) o retalho cirúrgico foi reposicionado e suturado por planos, sendo o plano muscular suturado através pontos contínuos simples com fio absorvível de Poliglactina 910 5-0 (Vicryl 5-0®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos,

Brasil). No plano cutâneo a sutura foi por pontos interrompidos simples com fio de Nylon 5-0 (ETHILON Nylon Suture®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil).

3.2 Cuidados Pós-Operatórios

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

4. Eutanásia e Coleta do Material

A eutanásia dos espécimes foi realizada nos períodos de 7, 15, 30 e 40 dias pós operatórios, sendo 8 animais por período. A eutanásia foi realizada por dose excessiva de anestésico para a remoção das tíbias que foram fixadas por 48 horas em formol (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) neutro a 10% tamponado.

5. Processamento Laboratorial

Após o período de 48 horas de fixação em formol, as peças foram descalcificadas em EDTA 20% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto- Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil), com trocas semanais da solução por um período de 6 semanas. Já descalcificadas, as peças foram desidratadas com trocas de álcool . Após estas etapas, foi realizado a diafanização com xilol (xilol I e xilol II) com trocas a cada 1 hora e 45 minutos e posteriormente foram incluídas em parafina para obtenção do corte com 5 µm de espessura e foram colocadas em lâminas (figura 17).

As lâminas foram separadas para a coloração com hematoxilina e eosina (HE). Previamente a realização das análises histométricas as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador conhece a qual grupos pertencem. Um único examinador realizou as análises desconhecendo o respectivo grupo da secção.

Após as lâminas serem coradas com HE (Merck&Co.,Inc.,NJ,EUA), mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR®DMLB, Heerbrugg,Suíça) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR®DC300F microsystems ltd, Heerbrugg, Suíça) e conectado a um microcomputador Core i7 com um software analisador de imagens digitalizadas, ImageJ® (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontário, Canadá). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem analisadas e foram projetadas na tela de um monitor Samsung (SyncMaster 3Ne, 15 polegadas). Os dados obtidos nas análises foram transformados em valores absolutos, de pixels, para valores percentuais relativos, de modo a minimizar a interferência da diferença do tamanho do negativo.

6. Análise estatística

A análise estatística foi conduzida por meio da comparação entre o grupo controle e o tratado. O teste estatístico empregado dependeu da distribuição desses dados em relação à curva de normalidade. Os testes foram conduzidos através de *software* SigmaPlot 12.0 utilizado para análise estatística em estudos na área de saúde.

Resultados

V. Resultados

1. Análise histológica

A análise histológica nos períodos estudados mostrou o reparo ósseo periimplantar no grupo GFO com um aumento progressivo da corticalização na interface osso/implante em todas as áreas correspondentes às espiras dos implantes, mostrando, ao final dos 40 dias, osso maduro, através de neoformação de osso em laminações concêntricas (Fig.18). No grupo GUS, também houve uma melhora no reparo ósseo, no entanto, na porção medular, uma pequena neoformação óssea foi observada com grande quantidade de tecido adiposo, caracterizando um atraso no reparo ósseo na região medular (Fig. 19).

2. ELCOI

O teste de Mann-Whitney a nível de significância de 5%, mostrou significância estatística do tratamento de fosfato de cálcio do grupo GFO quando comparado ao grupo GSU ($p < 0,001$) em todos os períodos estudados. Os maiores valores de ELCOI foram observados nos grupos GFO e aos 40 dias, com diferença estatística entre os dois grupos ($p = 0,0002$).

Discussão

VI. Discussão

Apesar dos excelentes resultados obtidos no protocolo desenvolvido em pacientes com boa qualidade e quantidade óssea, situações clínicas desfavoráveis, como áreas posteriores de maxila, áreas enxertadas, pacientes com alterações sistêmicas como diabetes, osteoporose e que apresentam pobre qualidade e quantidade óssea, podem influenciar o sucesso das reabilitações implantossuportadas (Thomas, Cook, 1992).

Modificações topográficas e físico-químicas da superfície dos implantes têm sido propostas para aumentar a porcentagem de contato osso-implante, principalmente em áreas de tecido ósseo de menor densidade, favorecer as respostas biológicas em um período de regeneração mais curto e, conseqüentemente, favorecer o sucesso em longo prazo dos implantes osseointegráveis (Xavier et al., 2003; Buser et al., 1998; Gotfredsen, Berglundh, Lindhe, 2001).

O CaP é uma cerâmica bioativa, exclusivamente osteocondutora, similar a hidroxiapatita, muito embora não seja um componente natural do osso (Carvalho, Luppino, Mendes, 2002; Schiliephak et al., 2003; Simank et al., 2006). Recobrimentos de superfície de implantes com fosfato de cálcio têm recebido especial atenção, já que aceleram a osseointegração, especialmente em condições de limitada quantidade e qualidade tecidual óssea (Hayakawa et al., 2000; Park et al., 2004). Inicialmente proposto por Abe et al. (1990), o método biomimético utiliza uma solução denominada Simulated Body Fluid (SBF) ou solução de fluido corpóreo (SFC), que possui composição química, temperatura e pH similares ao plasma sanguíneo. As principais vantagens desta técnica incluem a possibilidade de controle da espessura da camada depositada, o aumento da adesão ao substrato metálico e a topografia de superfície que aumenta a reposta do hospedeiro ao implante, favorecendo a osseointegração em períodos de tempo mais curtos (Kokubo, Takadama, 2006; Nogueras-Bayona et al., 2004).

As hipóteses dos autores nesta pesquisa é que o tratamento de superfície com fosfato de cálcio no grupo GFO melhoraria o processo reparacional periimplantar na comparação com o grupo GSU que mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Conclusão

VII. Conclusão

Sendo assim, ficou evidente que a superfície tratada com fosfato de cálcio conseguiu melhorar o reparo ósseo periimplantar nos implantes de titânio instalados em tíbias de ratos. Tendo em vista que somente após o carregamento, obtem-se a osseointegração (Albrektson 1989, Branemark, et al. 1977, Ericsson, et al. 2000, Ravald, et al. 2012), estudos futuros devem ser realizados com o intuito de avaliar essas superfícies são capazes de suportar cargas, através de micromovimentações aplicadas transcutaneamente sobre os implantes, em diferentes momentos do reparo ósseo, como realizado por Wazen et al (Wazen, et al. 2013).

Referências

VIII. Referências

1. Bergkvist G, Sahlholm S, Nilner K, Lindh C. Implant-supported fixed prostheses in the edentulous maxilla 2-year clinical and radiological follow-up of treatment with non-submerged ITI implants. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15: 351-9.
2. Coelho PG, Cardaropoli G, Suzuki M, Lemons JE. Early healing of nanothicknessbioceramic coatings on dental implants. An experimental study em dogs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;88(2):387-93.
3. Thomas K, Cook SD. Relationship between surface characteristics and the degree of bone-implant integration. *J Biomed Mater Res* 1992; 26 (6): 831-833.
4. Xavier SP, Carvalho PSP, Beloti MM, Rosa AL. Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. *J Dent* 2003; 31 (3): 173-180.
5. Buser D, Nydegger T, Hirt HP, Cochran DL, Nolte LP. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1998; 13(5): 611-619.
6. Gotfredsen K, Berglundh T, Lindhe J. Bone reactions adjacent to titanium implants with different surface characteristics subjected to static load. A study in the dog (II). *Clin Oral Implants Res* 2001; 12 (3): 196-201.
7. Lin A, Wang CJ, Kelly J, et al. The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone-implant fixation in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Sep-Oct; 24(5):808-16.
8. Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, et al. Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. *J Periodontol*. 2003 Jul;74(7):945-56.
9. Braga FJC, Marques RFC, Filho EA, et al.. Surface modification of Ti dental implants by Nd:YVO4 laser irradiation. *Appl Surf Sci* 2007; 253(23): 9203-9208.
10. Rani, Vinoth-Kumar, Anitha, Manzoor, Deepthy, Shantikumar. Osteointegration of titanium implant is sensitive to specific nanostructure morphology. *Acta Biomaterialia*. Volume 8, Issue 5, May 2012, Pages 1976 – 1989.
11. Shah F.A, Nilson B, Branemark R, Thompson P, Palmquist A. The Bone-implantinterface- nanoscale analysis of clinically retrieved dental implants. *Nanomedicine*. 2014 Jun 15. Pii:S1549-9634(14)00315-3.

12. Xiaohua, Yu.; Mei, W. Cellular Performance Comparison of Biomimetic Calcium Phosphate Coating and Alkaline-Treated Titanium Surface. Published online Dec 24, 2013. doi: 10.1155/2013/832790.
13. Nguyen T.D, Moon S.H, OH TJ, Park IS, Lee MH, Bae TS. The effect of APH treatment on surface bonding and osseointegration of Ti-6Al-7Nb implants: An in vitro and study. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2014 Jun 28.
14. Calvert KL, Desai T, Webster TJ. Advances in calcium phosphate coatings-anodicspark deposition: a review. Front Biosci (Landmarck Ed). 2014 Jan :19:475-89
15. Leung KC, Chow TW, Wat PY, Comfort MB. Peri-implant bone loss: management of a patient. Int J Oral Maxillofac Implants 2001;16:273-277
16. Isidor F. Influence of forces on peri-implant bone. Clin Oral Implants Res 2006;17 Suppl 2:8-18
17. Tabata LF, Rocha EP, Barao VA, Assuncao WG. Platform switching: biomechanical evaluation using three-dimensional finite element analysis. Int J Oral Maxillofac Implants 2011;26:482-491.
18. Dan-Jae L, Chien-Ping J, Huang SH, Tien YC, Yin HS, Chen WC, Chern Lin JH. Mechanical testing and osteointegration of titanium implant with calcium phosphate bone cement and autograft alternatives. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, October 2011; volume 4, Issue 7, Pages 1186–1195
19. Aparecida AH, Fook MVL, Gustaldi AC. Biomimetic apatite formation on Ultra-High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE) using modified biomimetic solution. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2009; n. 20, p. 1215-1222..
20. Queiroz, TP, Souza FA, Guastaldi AC, Margonar R, Guarcia-Júnior IR, Hochuli-Vieira E. Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and topographical analysis in rabbits. Clinical Oral Implants Research **JCR** 2013, v. 24, p. 896-903.
21. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? Biomaterials 2006; 27:2907-15
22. Carvalho PSP, Luppino F, Mendes VC: Histofisiologia óssea e os biomateriais aplicados à implantodontia. In: BEZERRA FJ Terapia clínica avançada em implantodontia (ed 1). São Paulo, Artes Médicas, 2002, p 17.
23. Schliephake H, Sharnweber D, Dard M, et al: Biological performance of biomimetic calcium phosphate coating of titanium implants in the dog mandible. J Biomed Mater Res 64A: 225, 2003.

24. Simank HG, Stuber M, Frahm R, et al: The influence of surface coatings of dicalcium phosphate (DCPD) and growth and differentiation factor-5 (GDF-5) on the stability of titanium implants in vivo. *Biomaterials* 27: 3988, 2006.
25. Hayakawa T, Yoshinari M, Nemoto K, et al. Effect of surface roughness and calcium phosphate coating on the implant/bone response. *Clin Oral Implants Res.* 2000 Aug; 11(4):296-304
26. Park EK, Lee YE, Choi JY, et al. Cellular biocompatibility and stimulatory effects of calcium metaphosphate on osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells. *Biomaterials.* 2004 Aug; 25(17):3403-11.
27. Abe Y, Kokubo T, Yamamuro T. Apatite Coating on Ceramics, Metals and Polymers Utilizing A Biological Process. *J Mater Sci Mater Med* 1990; 1(4): 233-38.
28. Nogueras-Bayona J, Gil FJ, Salsench J, Martinez-Gomis J. Roughness and bonding strength of bioactive apatite layer on dental implants. *Implant Dent* 2004; 13 (2): 185-189.
29. Albrektson. The Branemark osseointegrated implant. . Chicago: Quintessence; 1989. 262 p.
30. Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10- year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.* 1977; 16:1-132. PubMed PMID:. 356184 Epub 01/01/1977. eng.
31. Ericsson I, Randow K, Nilner K, Peterson A. Early functional loading of Branemark dental implants: 5-year clinical follow-up study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2000; 2 (2) :70-7. PubMed PMID:. Epub 11359266 19/05/2001. eng.
32. Ravald C, Dahlgren S, Teiwik A, Grondahl K. Long-term evaluation of Astra Tech and Branemark implants in Patients treated with full-arch bridges. Results after 12-15 years. *Clin Oral Implants Res* 2012 Jul 4 PubMed PMID:.. 22,762,251 Epub 2012/07/06. Eng
33. Wazen RM, Currey JA, Guo H, Brunski JB, Helms JA, Nanci A. Micromotion-induced strain fields influence early stages of repair at bone-implant interfaces. *Acta Biomater.* 2013 Apr, 9 (5): 6663-74. PubMed PMID: 23337705 PubMed Central PMCID:. Pmc3622828. Epub 23/01/2013. eng.

Figuras



Figura 1: Implantes antes do tratamento de superfície.



Figura 2: Água deionizada em agitação



Figura 3: Compostos usados para o preparo da solução de fluido corporal.



Figura 4: Valor do pH da solução de fluido corporal no phametro.



Figura 5: Banhos em H_2O_2



Figura 6: Ticp imersos em SFC mais CaP.

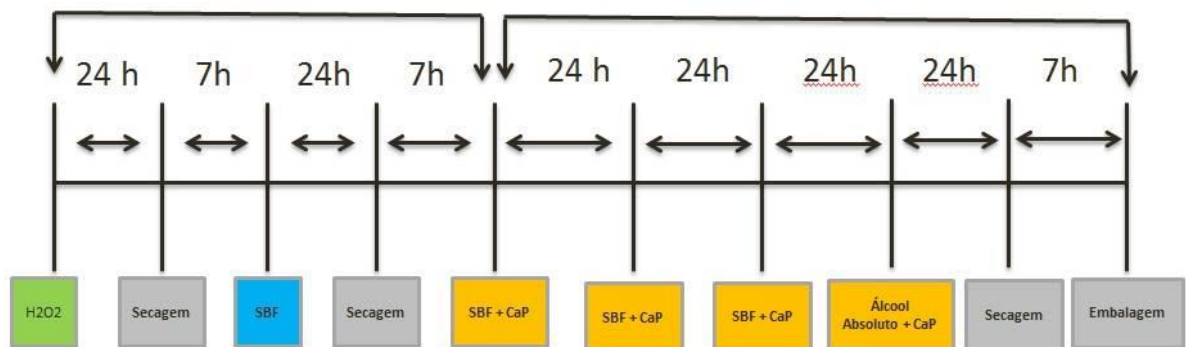


Figura 7: Baseline da segunda e terceira etapa de modificação da superfície



Figura 8: Implantes no banho de água oxigenada

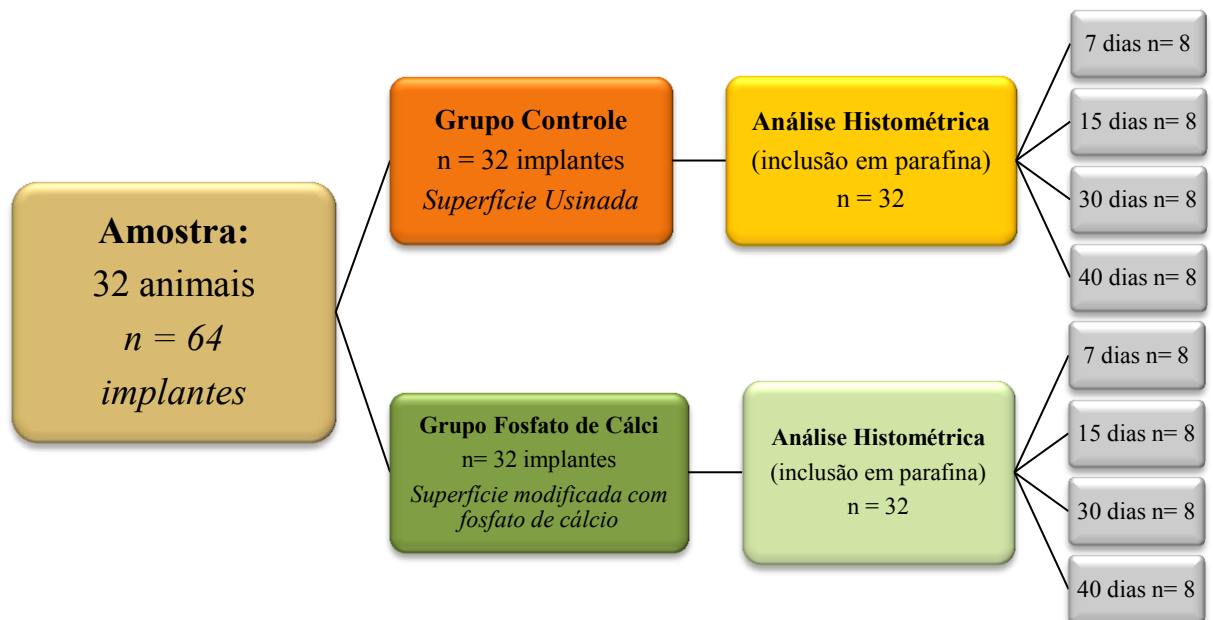


Figura 9: Delineamento experimental dos grupos do estudo



Figura 10: Tricotomia e antissepsia com PVP-I na metáfise tibial

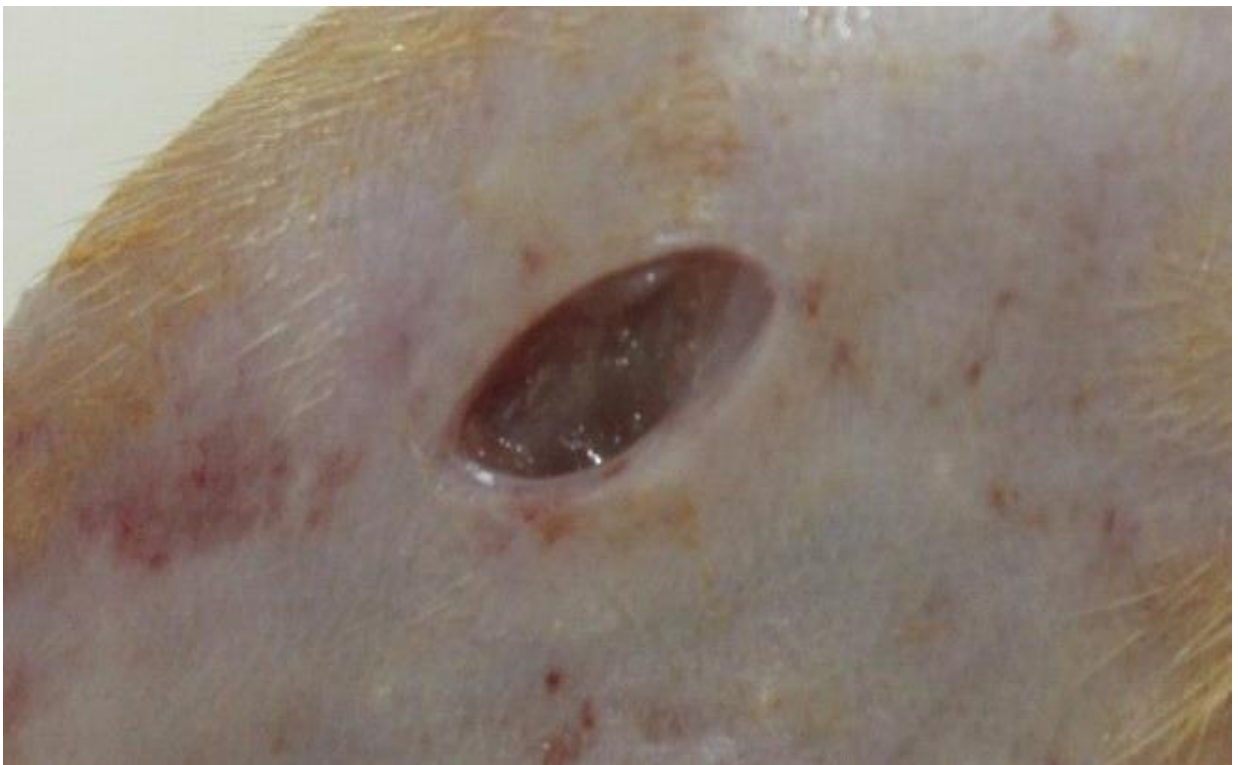


Figura 11: Incisão linear na lateral da metáfase tibial



Figura 12: Após incisão e divulsão por planos, acesso à metáfise tibial.



Figura 13: Fresa de 1,4 mm de diâmetro posicionada para osteotomia.



Figura 14: Osteotomia - leito ósseo fresado para instalação de implante.



Figura 15: Implante sendo instalado com chave digital.

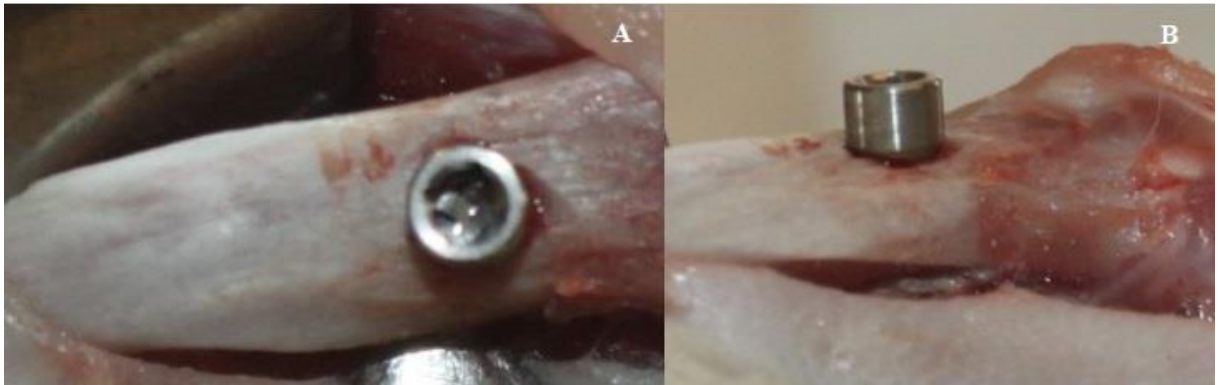


Figura 16: Implantes instalados sob vista superior (A) e lateral (B), respectivamente.



Figura 17: Processamento histológico

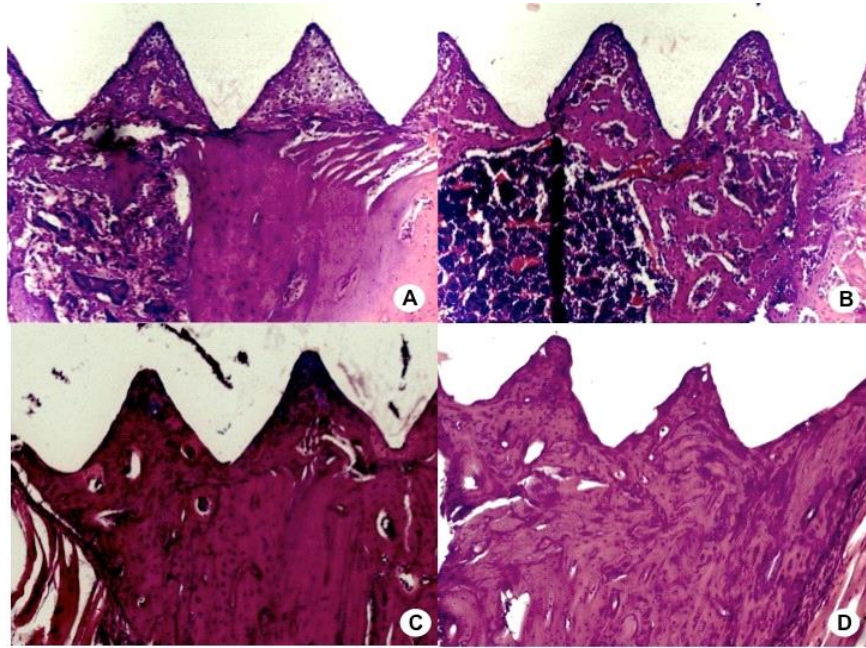


Figura 18: Imagens histológicas dos cortes em parafina após a remoção do implante do grupo GFO aos A: 7 dias; B: 15 dias, C: 30 dias e D: 40 dias, corados com HE, aumento de 125x.

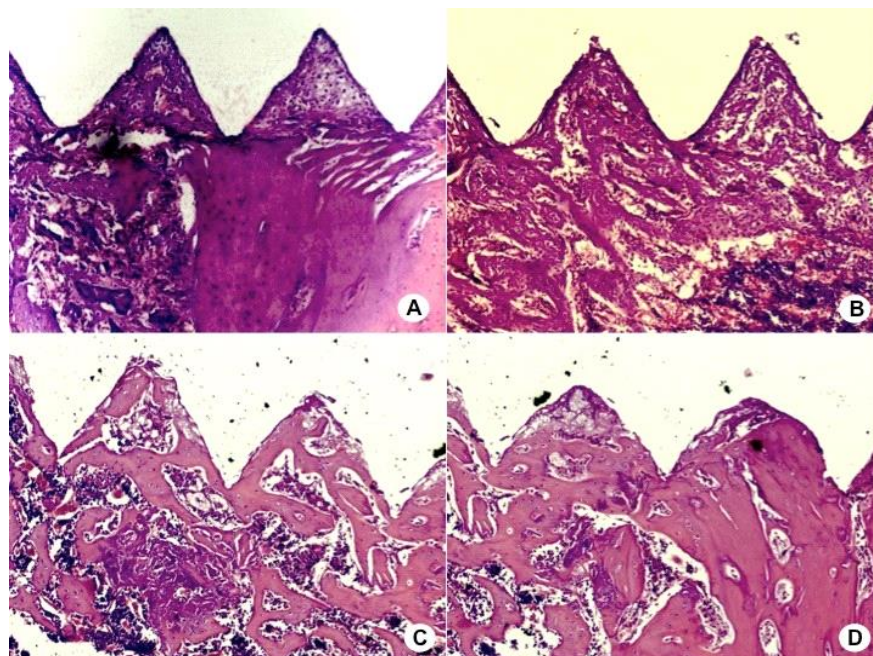


Figura 19: Imagens histológicas dos cortes em parafina após a remoção do implante do grupo GUS aos A: 7 dias; B: 15 dias, C: 30 dias e D: 40 dias, corados com HE, aumento de 125x.

Anexo



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

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

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 06 de Setembro de 2014.

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

CERTIFICATE

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

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: September 06, 2014.

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

Prof. Dr. Edison Ervolino
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Aracatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Menção - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (16) 3635-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

