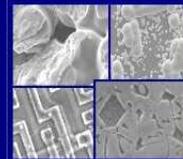




PUCRS

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia
Faculdade de Física
Faculdade de Química



PGETEMA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE IMPLANTES
NANOTEXTURIZADOS DE TITÂNIO ASSOCIADO À LIBERAÇÃO
GRADUAL DE FÁRMACOS**

PAULA PRÁ VELEDA

BACHAREL E LICENCIADA EM FÍSICA

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DOS MATERIAIS

**TESE PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre

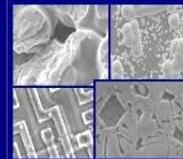
Agosto, 2012



PUCRS

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia
Faculdade de Física
Faculdade de Química



PGETEMA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE IMPLANTES
NANOTEXTURIZADOS DE TITÂNIO ASSOCIADO A LIBERAÇÃO
GRADUAL DE FÁRMACOS**

PAULA PRÁ VELEDA

BACHAREL E LICENCIADA EM FÍSICA

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTO HÜBLER

Tese realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre
Agosto, 2012**

“Na vida não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fizemos de nós!” (Chico Xavier)

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese às duas pessoas mais importantes da minha vida - meu pai Paulo, com quem aprendi que quando se quer uma coisa de verdade é preciso ter muita força de vontade para conseguir o que se deseja e que cada dia é mais um dia para ser vivido e vencido, e minha mãe, que é sem dúvida a melhor mãe do Mundo. Pra vocês o meu Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me dar força, coragem, inteligência e condições de chegar até aqui.

Agradeço aos meus familiares: meu pai Paulo, à minha mãe Márcia e ao meu irmão Márcio por estarem sempre ao meu lado me dando toda força, carinho, amor e por sempre acreditarem no meu potencial.

Ao meu futuro esposo Luis André que nesse período do doutorado não mediu esforços de me ajudar e principalmente de compreender esta fase me dando apoio, carinho, amor e torcendo muito por mim. Sempre fazendo eu acreditar que eu ia conseguir.

Ao meu professor orientador Roberto Hübler pelos conselhos, pela paciência, apoio, confiança, acompanhamento do trabalho e principalmente por me ajudar a vencer as minhas dificuldades.

Ao pessoal do GEPSI, em especial à Mariane, André e Renata. Obrigada, pessoal!

Agradeço ao cirurgião-dentista Dr. Marcelo Emir Abreu pela ajuda no trabalho.

Agradeço aos meus grandes amigos Billy, Felipe, Fernanda e Filipe pelo apoio, amizade, carinho e por entenderem o porquê da minha ausência.

Agradeço aos meus mais novos amigos Adrian, Ricardo Rippel, Ricardo Galileo e Anderson pela amizade e conselhos.

Agradeço ao Sr. Bernardo Reis, por muitas vezes entender os meus atrasos e faltas no trabalho.

Agradeço aos meus padrinhos Mário e Cintia por sempre me apoiarem nas minhas decisões e principalmente por acreditarem no meu potencial. Muito Obrigada!

Agradeço a minha tia-avó Ignês pelos conselhos e pelas preocupações de eu estar sempre estudando.

Agradeço ao pessoal do MEV Wagner e Mirian.

Agradeço à PUCRS pelo espaço do Laboratório do Tecnopuc para realização das pesquisas e pela bolsa de estudo.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	5
SUMÁRIO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE SÍMBOLOS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1. Tecido Ósseo.....	20
3.2. Inflamação e Reparo Tecidual.....	22
3.2.1. Inflamação	22
3.2.1.1. Inflamação Aguda.....	24
3.2.1.2. Inflamação Crônica	24
3.2.2. Reparo Tecidual.....	26
3.2.2.1. Reparo ósseo.....	26
3.3. Osseointegração	27
3.4. Implantes	29
3.4.1. Titânio	29
3.4.2. Tratamento de Superfícies.....	30
3.4.2.1. Plasma-Spray (PSA).....	32
3.4.2.2. Nanotexturização	33
3.5. Hormônio do Crescimento	36
3.6. Métodos para Caracterização de Superfície	37
3.6.1. Imagem (MEV e MO)	37

3.6.2. Composição por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	39
3.6.3. Avaliação da Qualidade do Osso Neoformado: Teste Biomecânico de Tração (Pull-out).....	39
3.7. Técnicas Histológicas.....	40
3.8. Testes <i>in-vivo</i>	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1. Fabricação e Preparação dos Implantes.....	44
4.2. Fase Experimental.....	45
4.3. Composição dos Grupos Experimentais	46
4.4. Cálculo da amostra	47
4.5. Modelo Experimental em Animal e Procedimento Cirúrgico	47
4.6. Preparação do Corpo de Prova.....	50
4.6.1. Histomorfologia (Método HE).....	50
4.6.2. Preparação das amostras para o MO, MEV e FTIR	52
4.6.3. Preparação das Amostras para <i>Pull-Out</i>	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
5.1. Avaliação qualitativa da Histologia por Microscópio Óptico	59
5.2. Avaliação qualitativa das Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	63
5.3. Análise do espectro de Infra-vermelho (FTIR)	65
5.4. Análise Biomecânica de Tração (<i>pull-out</i>) e Espectro de Energia Dispersiva (EDS)	66
6. CONCLUSÃO	70
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Reposição de dentes utilizando dentes de animais em (a) e de humanos em (b).....	15
Figura 1.2. Implantes Rudimentares.	16
Figura 3.1. Osso compacto e esponjoso com suas estruturas [16].....	21
Figura 3.2. Células intravasculares, células do tecido conjuntivo e matriz extracelular envolvidas na resposta inflamatória [19]	22
Figura 3.3. Esquema que mostra os dois tipos de inflamação [20].....	23
Figura 3.4. Alteração do fluxo sanguíneo associado à inflamação [20].	25
Figura 3.5. Destruição tecidual característica de um processo inflamatório crônico [20].	25
Figura 3.6. Processo de reparo ósseo [23].	27
Figura 3.7. Processo de tratamento de superfície plasma-spray.....	33
Figura 4.1. Implante de titânio plasma-spray (a) e implante plasma-spray nanotexturizado (b).	44
Figura 4.2. Fotografia da tíbia do coelho mostrando os implantes PSA-nano, PSA e liso.....	45
Figura 4.3. Duas cavidades ósseas de 2,2 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade foram confeccionadas, separadas 16 mm entre si.....	49
Figura 4.4. Tíbia do coelho após a liofilização.	52
Figura 4.5. Corpo de prova antes do polimento.	53
Figura 4.6. Corpo de prova polido e lixado, pronto para ser analisado no MO.	53
Figura 4.7. Picos de energia do FTIR.	54
Figura 4.8. Gráfico absorvância x nº de ondas que permite o cálculo das áreas dos picos de cada um dos componentes químicos.	55

Fig. 4.9. Conjunto contendo a tíbia e os implantes embebidos em resina de poliéster insaturada, pronto para o teste pull-out.....	56
Figura 4.10. Pinça utilizada no teste biomecânico de pull-out.	57
Figura 4.11. Teste de tração (pull-out) sendo realizado na máquina de testes universal (EMIC DL-2000®) e o computador que mostra a curva de tensão-deformação.	57
Figura 4.12. Retângulo da imagem do implante no MEV para análise por EDS.....	58
Figura 5.1. Micrografia com magnificação de 50x na interface osso-implante das amostras do grupo controle (a) IC14; (b) IIC14; (c) IC42 e (d) IIC42.	60
Figura 5.2. Micrografia com magnificação de 100x na interface osso-implante das amostras IC14 (a); IH14 (b); IIC14 (c); IIH14 (d); IC42 (e); IH42 (f); IIC42 (g); IIH42 (h).	62
Figura 5.3. Microscopia eletrônica com magnificação de 100x da interface osso implante das amostras do grupo controle (a) IC42; (b) IIC42; (c) IH42 e (d) IIH42.	64
Figura 5.4. Espectro de FTIR das amostras com tempo de cicatrização de 42 dias.	66
Figura 5.5. Análise quantitativa de fósforo e cálcio.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Composição dos grupos experimentais (I = Grupo I - implantes PSA; II = Grupo II implantes PSA-nano; C = ausência do hormônio do crescimento ou controle; H = presença do hormônio ou teste; 14d = 14 dias de cicatrização; 42d = 42 dias de acompanhamento).....	46
Tabela 4.2. Implantes divididos pelo tipo de caracterização realizada.	51
Tabela 5.1. Valores da área de fosfato e colágeno pela técnica do FTIR.	65
Tabela 5.2. Valores de resistência à tração pelo teste <i>pull-out</i>	66
Tabela 5.3. Quantidade de cálcio e fósforo na superfície analisadas pelo EDS.....	67
Tabela 5.4. Mostra a razão de cálcio/fósforo.	68

LISTA DE SÍMBOLOS

Espectro de Dispersão de Energia	EDS
Espectro de infravermelho	FTIR
Hemotoxilina –eosina	HE
Hormônio do Crescimento Humano Recombinante	rhGH
Kilograma	kg
Micrômetro	µm
Microscopia Eletrônica de Varredura	MEV
Microscopia de Infravermelho	µFTIR
Microscopia Óptica	MO
Miligrama	mg
Milímetro	mm
Nanômetro	nm
Pascal	Pa
Plasma Spray Atmosférico	PSA
Plasma Spray Nanotexturizado	PSA-nano
Porcentagem	%

RESUMO

VELEDA, Paula. *Produção e Caracterização de Implantes Nanotexturizados de Titânio Associado à Liberação Gradual de Fármacos*. Porto Alegre. 2012. Proposta de tese e Biomateriais. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vivo*, o efeito de dois diferentes tratamentos de superfície de implantes de titânio - plasma-spray (PSA) e plasma-spray nanotexturizado (PSA-nano) - na interface osso-implante (osseointegração), associados ou não ao hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH). Vinte e quatro protótipos de implantes de titânio puro, medindo 6 mm de comprimento por 2 mm de diâmetro, foram especialmente confeccionados em uma forma cilíndrica e colocados na tíbia de 12 coelhos da raça New Zealand. Os implantes foram divididos em quatro grupos: 1) implantes PSA sem rhGH, 2) implantes PSA com rhGH, 3) implantes PSA-nano sem rhGH e, por último, 4) implantes PSA-nano com rhGH. Os animais foram sacrificados 14 e 42 dias após as cirurgias. As amostras foram coletadas e analisadas por microscopia óptica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de infravermelho (μ -FTIR), além do teste mecânico de *pull-out*. Os resultados mostraram que no estágio inicial da cicatrização, o hormônio do crescimento recombinante humano favoreceu a neoformação óssea, independente do tipo de superfície. Porém, no estágio tardio, a nanotexturização, sem a presença do hormônio, exerceu uma influência positiva na neoformação óssea, quando comparada ao seu emprego com o hormônio. Neste estágio, apenas a superfície de plasma-spray (PSA) foi favorecida pelo hormônio do crescimento.

Palavras-Chaves: implantes de titânio; osseointegração; nanotexturização; microscópio óptico; microscopia de infravermelho.

ABSTRACT

VELEDA, Paula. *Production and Characterization of Nano-Textured Titanium Implants Associated to the Gradual Release of Drugs*. Porto Alegre. 2012. PhD Thesis. Post-Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The aim of this study was to assess, *in vivo*, the effect of two different surface treatments of titanium implants - plasma-spray (PSA) and nano-textured plasma-spray (PSA-nano) - at the bone-to-implant interface (osseointegration), associated or not to the recombinant human growth hormone (rhGH). Twenty-four prototypes of pure titanium implants, 6-mm long and 2-mm wide, were especially fabricated in a cylindrical shape and placed in 12 New Zealand rabbit's tibiae. The implants were divided into four groups: 1) PSA implants without rhGH, 2) PSA implants with rhGH, 3) PSA-nano implants without rhGH and, lastly, 4) PSA-nano implants with rhGH. The animals were sacrificed 14 and 42 after the surgeries. Samples were collected and analysed by optical microscopy (OM), scanning electronic microscopy (SEM) and infrared microscopy (μ -FTIR), besides the pull-out mechanical test. The results showed that in the early stage of osseointegration, the recombinant human growth hormone has favored new bone formation, regardless the surface treatment. However, in the later stage, the nano-textured surface, even without the hormone, has made a positive influence on the new bone formation, when compared to its use with hormone. In this stage, only the plasma-spray surface (PSA) has been favored by the growth hormone.

Key-words: *titanium implants; osseointegration; nano-texturing; optical microscopy; infrared microscopy.*

1. INTRODUÇÃO

A utilização de implantes dentários para a reposição dos elementos * faltantes não é recente. Descobertas antropológicas na Europa, no Oriente e na América Central indicam que o homem tentou repor dentes perdidos com alguns materiais, incluindo dentes humanos, de animais, osso esculpido e pedaços de marfim e pérola, através de amarras nos dentes remanescentes. Essa reposição tinha apenas finalidade estética, pois funcionalmente era inútil (figura 1.1a e 1.1b) [1].

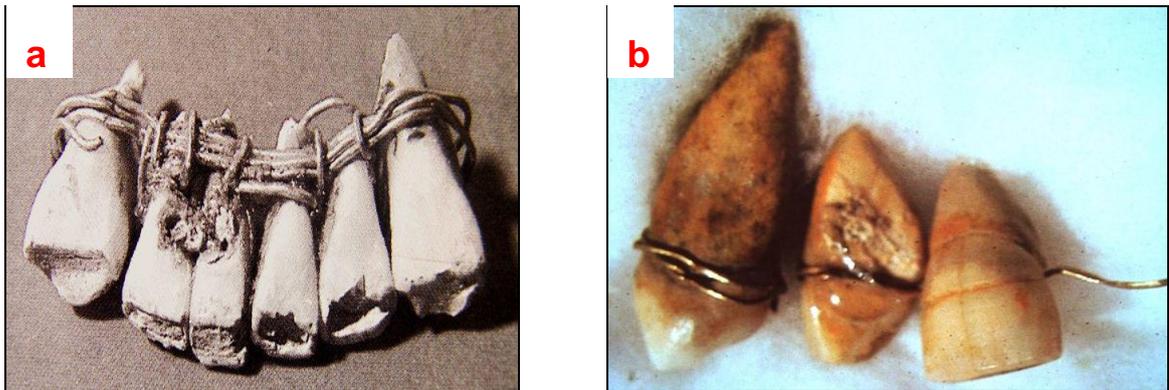


Figura 1.1. Reposição de dentes utilizando dentes de animais em (a) e de humanos em (b).

A substituição de dentes perdidos foi muito utilizada no século XVII, quando o transplante dentário era moda nos círculos sociais nobres da França e da Inglaterra. Os dentes transplantados eram de jovens que recebiam dinheiro para oferecê-los. Entretanto, devido ao alto índice de fracassos e dos riscos de transmissão de doenças, esse tipo de procedimento caiu em desuso [2].

A partir do século XVIII, com o desenvolvimento das ciências e com a transferência dos conhecimentos científicos e métodos para a área biomédica foram reali-

zadas várias tentativas de substituição de dentes perdidos, através da utilização de implantes de diferentes materiais [1,2].

A reposição de vários dentes através de implantes surgiu com Hartmann, em 1891. Ele teve a ideia que a prótese dentária fosse fixada por meio de parafusos sobre implantes no formato de raiz. Esse método foi pouco utilizado devido ao grande número de fracassos, induzindo desta maneira a tentativa de mudança na forma da raiz dentária dos implantes por Strock em 1939. Foi utilizada uma liga de cromo-cobalto-molibdênio para a criação de implantes dentários, provido de roscas que se assemelhavam a um parafuso de madeira (figuras 1.2a e 1.2b) [2].

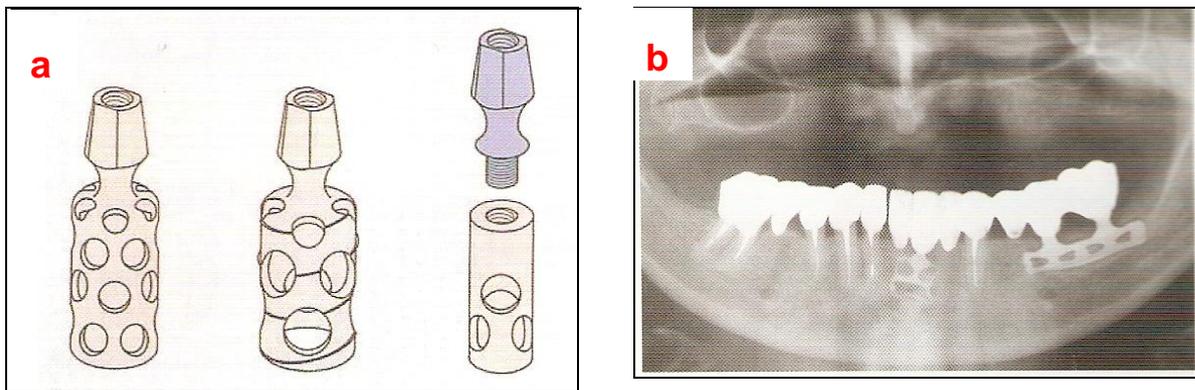


Figura 1.2. Implantes Rudimentares.

Através dos estudos de Per-Ingvar Brånemark, na década de 60 no século passado, percebeu-se que o metal titânio, quando introduzido no osso com menor trauma e incisão cirúrgica, promovia a adesão do osso ao metal com grande tenacidade. A estrutura metálica tornava-se incorporada ao osso vivo numa forma que se imaginava ser impossível. Brånemark compreendeu o significado dessa forma de mecanismo de fixação [3].

Desde então, o uso do titânio e de suas ligas tem sido aplicado para a confecção de implantes odontológicos e ortopédicos devido à sua biocompatibilidade e à excelente osteocondução, sem a interposição de tecido inflamatório crônico ou conjuntivo [3]. Esta característica de interação do titânio com o tecido ósseo iniciou a revolução da ciência Implantodontia com os trabalhos de Brånemark [3] e gerou a

origem do termo osseointegração [3], ou seja, o contato estrutural e funcional direto entre o tecido ósseo e a superfície de titânio do implante.

Dentre os principais fatores para o sucesso de um implante, pode-se destacar a biocompatibilidade, a estabilidade primária e a osseointegração, sendo que esta última é responsável pela vida útil do implante e pela possibilidade do uso de carga mecânica. Assim, quanto mais rápida e efetiva for a osseointegração de um implante, mais rápido também será a liberação do paciente para as atividades normais, diminuindo assim os transtornos pós-cirúrgicos e os custos com revisões [4].

Pesquisas recentes têm investido na busca de soluções para aumentar a área de contato direto entre osso e o implante, além de reduzir o intervalo de tempo para que ocorra a osseointegração. Uma das alternativas mais estudadas é o desenvolvimento de implantes com variadas formas e diferentes tratamentos da superfície de titânio [5-6]. Esses tratamentos incluem processos de modificação da microtopografia e rugosidade superficial, como jateamento de partículas, ataque ácido, anodização eletroquímica, recobrimento com camada de matérias biocompatíveis, técnicas de implantação iônica e técnica de aspersão a plasma [7].

Mais recentemente, a nanotecnologia permitiu a construção de novos materiais e dispositivos pela manipulação de átomos individuais e moléculas. As nanotecnologias estão sendo cada vez mais usadas para modificações da superfície dos implantes dentários. Além disso, a combinação entre tratamentos de superfície de implantes de titânio com a utilização de substâncias osteoindutoras, como as proteínas morfogênicas ósseas, os bisfosfonados, os fatores de crescimento e, mais recentemente, o hormônio do crescimento vem aumentando progressivamente, de maneira a acelerar o processo de osseointegração [8,9,10].

O hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) é produzido pela adenohipófise, ao longo de toda a vida do indivíduo e tem como principais ações: regular o anabolismo de proteínas e o catabolismo de ácidos graxos. O rhGH é responsável, no período de crescimento do indivíduo, pela sua estatura anatômica [8].

A síntese de substâncias endógenas, como o rhGH, foi possível a partir da polimerização em cadeia [9,11].

Devido ao efeito sistêmico do rhGH, uma aplicação massiva apenas, durante a cirurgia, não traz os efeitos desejados. Por este motivo, pesquisadores têm aplicado doses regulares, durante o tempo de osseointegração, dando margem aos efeitos colaterais do hormônio. Uma possível solução a ser testada seria a liberação gradual do rhGH no local do implante para verificar se o efeito pode ser predominantemente tópico [8,9,11].

Embora estudos recentes com animais tenham utilizado o rhGH no reparo ósseo, associado a implantes; não existem evidências mostrando o efeito desta substância, associada à nanotexturização da superfície do implante. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do uso de superfícies nanotexturizadas associadas, ou não, ao hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) no processo de osseointegração de implantes de titânio.

A execução deste trabalho foi feita em parceria com a Faculdade de Odontologia da PUCRS, no projeto “Avaliação do Hormônio do Crescimento Humano Recombinante (rhGH) no Processo de Osseointegração de Implantes de Titânio Submetidos a Diferentes Tratamentos de Superfície”, coordenado pelo professor Doutor Rogério Miranda Pagnoncelli.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Estudar a influência das superfícies nanotexturizadas no processo de osseointegração de implantes de titânio.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de dois diferentes tipos de tratamento de superfície no processo de osseointegração;
- Verificar o papel do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) no processo de osseointegração;
- Analisar a qualidade do processo de osseointegração por técnicas de caracterização não convencionais em ensaios biológicos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo cuja matriz extracelular é mineralizada e rígida, o que por sua vez lhe confere propriedades ideais para as funções de suporte e proteção dos organismos vertebrados. Este tecido dispõe-se, formando os ossos, estruturas rígidas e resistentes que compõem o esqueleto, apresentando propriedades mecânicas e biológicas distintas e diferenciáveis. Dentre os tecidos de suporte, o tecido ósseo é considerado o que possui o mais alto grau de rigidez e resistência à pressão. Além das propriedades mecânicas, o osso exerce uma importante função metabólica no equilíbrio da homeostasia mineral, agindo como reservatório de cálcio e fosfato. Ainda funciona como local de hematopoese e exibe um extraordinário potencial de reparo [12].

O crescimento, a formação e o desenvolvimento do tecido ósseo humano ocorrem durante o desenvolvimento embrionário e seguem até a idade adulta. Durante toda a vida, os ossos apresentam um processo combinado e dinâmico de reabsorção e neoformação, denominado de remodelação óssea. Este processo é contínuo e fisiológico, permitindo que o tecido ósseo se renove constantemente, responda aos estímulos externos e também sofra reparação [13]. Esta remodelação é determinada pela carga genética e se mostra dependente de regulação e das influências endócrinas, bioquímicas e ambientais. Mesmo no adulto, o tecido ósseo é metabolicamente ativo e a manutenção da matriz é resultado de um delicado balanço de atividades de síntese e reabsorção, as quais refletem as atividades antagonistas de osteoblastos e osteoclastos, respectivamente [14]. A cooperação entre osteoclastos e osteoblastos é responsável não só pela formação, remodelação e reparo

do osso, mas também pela manutenção, a longo prazo, da homeostase do cálcio e do fosfato no organismo [14-15].

Os ossos são revestidos, em suas superfícies externa e interna, por membranas conjuntivas ricamente vascularizadas, denominadas periósteo e endósteo, respectivamente. Estas membranas apresentam células osteoprogenitoras, cujas principais funções são de nutrição e osteogênese, necessárias para o crescimento e a reparação dos ossos. Os vasos sanguíneos do endósteo e do periósteo ramificam-se e penetram nos ossos através de canais, encontrados na matriz óssea (Figura 3.1).

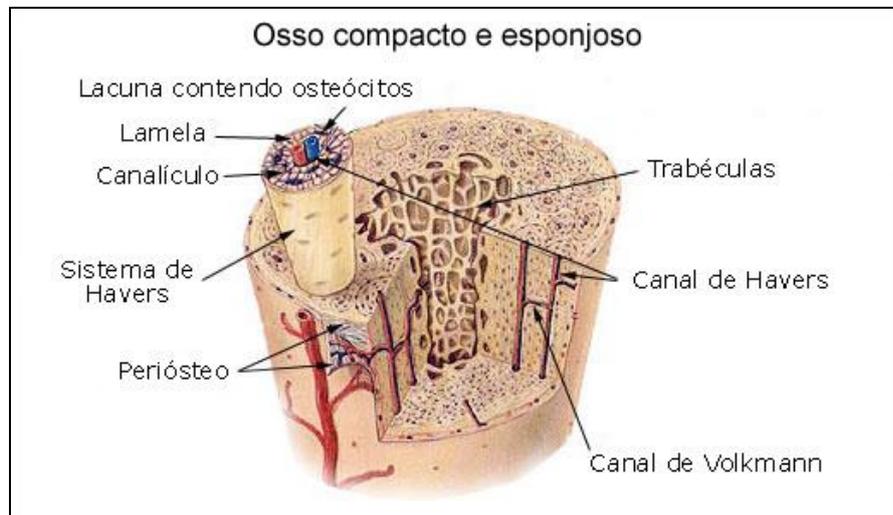


Figura 3.1. Osso compacto e esponjoso com suas estruturas [16].

O componente celular do tecido ósseo é constituído pelos osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células osteoprogenitoras. Os osteoblastos são derivados de células osteoprogenitoras, responsáveis pela síntese dos constituintes orgânicos da matriz óssea e também pela concentração de cálcio e de fósforo, participando da mineralização desta matriz [17]. Da mesma forma, o colágeno tipo I, responsável por 90% da constituição proteica óssea, participa desse processo de mineralização da matriz óssea, servindo como uma espécie de arcabouço.

3.2. Inflamação e Reparo Tecidual

Um tecido vivo que sofreu agressão, que foi perdido ou tratado cirurgicamente, responde através de um processo fisiológico chamado de inflamação ou reparo.

3.2.1. Inflamação

A inflamação é uma resposta protetora cujo objetivo final é libertar o organismo da causa inicial da lesão celular. É desencadeada por infecções microbianas, agentes físicos, substâncias químicas, tecidos necróticos ou por uma reação imune. A resposta inflamatória deve conter e isolar a lesão, destruir os microrganismos invasores e as toxinas inativas preparar o tecido para a recuperação. Ela envolve o tecido conjuntivo incluindo o plasma, células circulantes, vasos sanguíneos e constituintes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo (figura 3.2) [18].

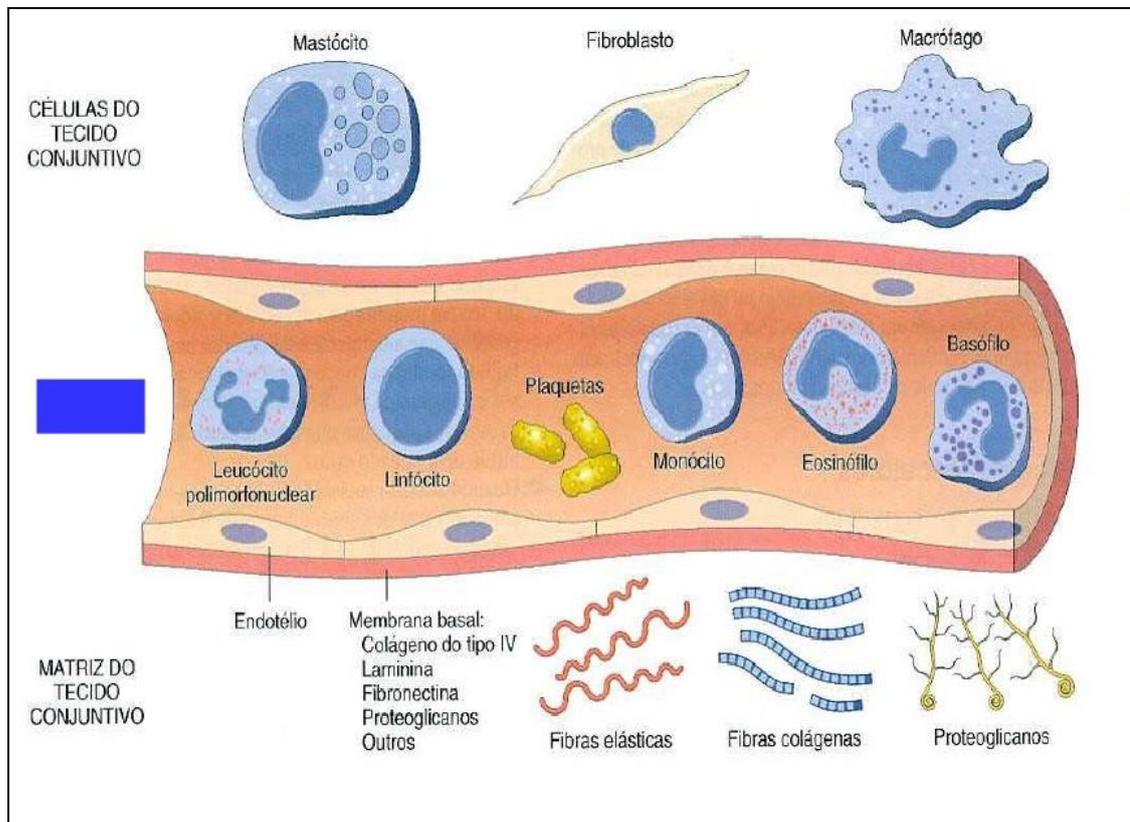


Figura 3.2. Células intravasculares, células do tecido conjuntivo e matriz extracelular envolvidas na resposta inflamatória [19]

A inflamação está intimamente relacionada ao processo de reparo; ela serve para destruir, diluir ou isolar o agente lesivo, em uma série de eventos que tendem a cicatrizar o tecido lesado. Durante o reparo, este tecido é substituído pela reparação com células parenquimatosas nativas, ou por preenchimento do defeito com tecido cicatricial fibroblástico (fibrose), ou mais comumente, por uma associação destes dois processos [18].

Existem dois tipos de inflamação: a inflamação aguda e a inflamação crônica. A aguda tem duração curta, pode ser de alguns minutos, várias horas, ou poucos dias, e suas principais características são a exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas e a emigração de leucócitos, predominantemente neutrófilos. A crônica, por sua vez, tem um tempo de duração maior e está associada, histologicamente, à presença de linfócitos e macrófagos e à proliferação de vasos sanguíneos e tecido conjuntivo [18]. A figura 3.3 ilustra os dois tipos de inflamação [21].

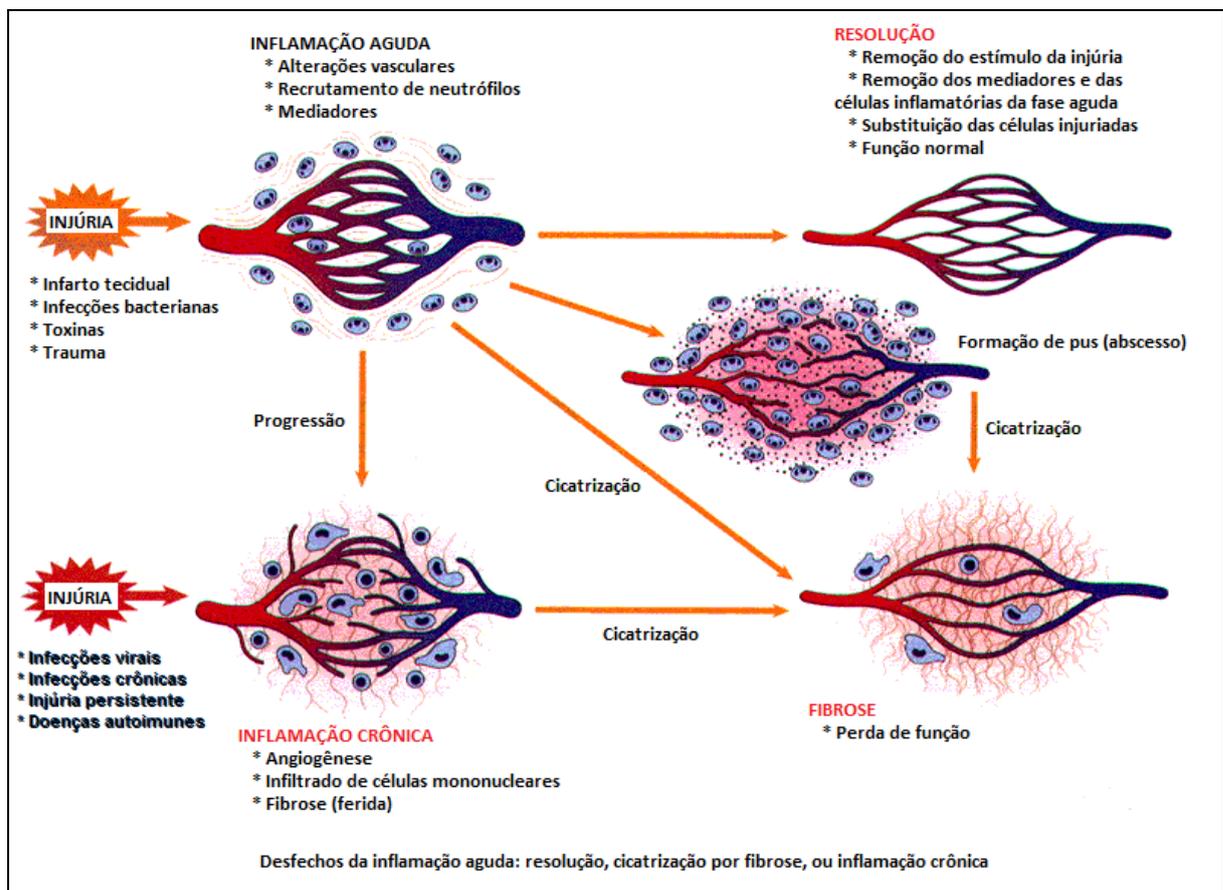


Figura 3.3. Esquema que mostra os dois tipos de inflamação [20].

3.2.1.1. Inflamação Aguda

A inflamação aguda inicia-se rapidamente e tem uma duração relativamente curta; envolve a exsudação de líquido e migração de células polimorfonucleares [22]. É a responsável inicial e imediata por um agente lesivo. Como os dois principais componentes de defesa contra micróbios — anticorpos e leucócitos — são normalmente carregados na corrente sanguínea, não é surpresa que os fenômenos vasculares desempenhem um papel importante na inflamação aguda. Portanto, a inflamação aguda possui três principais componentes: alteração do calibre vascular que leva ao aumento do fluxo sanguíneo; alterações estruturais na rede microvascular que permitem as proteínas plasmáticas e os leucócitos deixarem a circulação como também a emigração dos leucócitos da microcirculação e seu acúmulo no local da lesão. Esses componentes contribuem para os clássicos sinais de inflamação: calor, rubor, edema e dor [18].

Os fenômenos vasculares são caracterizados pelo aumento do fluxo sanguíneo para a área lesada, resultando em uma dilatação arteriolar e abertura de leitos capilares. O aumento da permeabilidade vascular acarreta no acúmulo de fluido extravascular rico em proteínas que, por sua vez, forma o líquido extravascular inflamatório (Figura 3.4).

3.2.1.2. Inflamação Crônica

É um processo mais demorado que a inflamação aguda, ocorre em algumas semanas ou meses e é caracterizada por inflamação ativa (infiltrado de células mononucleares), com destruição tecidual e tentativa de reparar os danos (cicatrização). Pode ser a continuação de uma reação aguda, mas, muitas vezes, acontece de maneira insidiosa, como uma reação pouco intensa e frequentemente assintomática. As células apresentadoras de antígenos, os macrófagos, são ativadas para combater esse processo e secretam vários mediadores químicos da inflamação, os quais, se não controlados, podem levar à destruição do tecido lesado e fibrose, características desse tipo de inflamação. É causada por infecções persistentes, exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos, endógenos ou exógenos. Uma das características da inflamação crônica é a destruição tecidual (Figura 3.5). Outras

substâncias podem contribuir para isso, além das produzidas pelos macrófagos. As próprias células necróticas do tecido inflamado podem iniciar a cascata inflamatória, ativando o sistema das citocinas, coagulação e fibrinolítico e liberação de mediadores pelos leucócitos responsivos ao tecido necrótico.

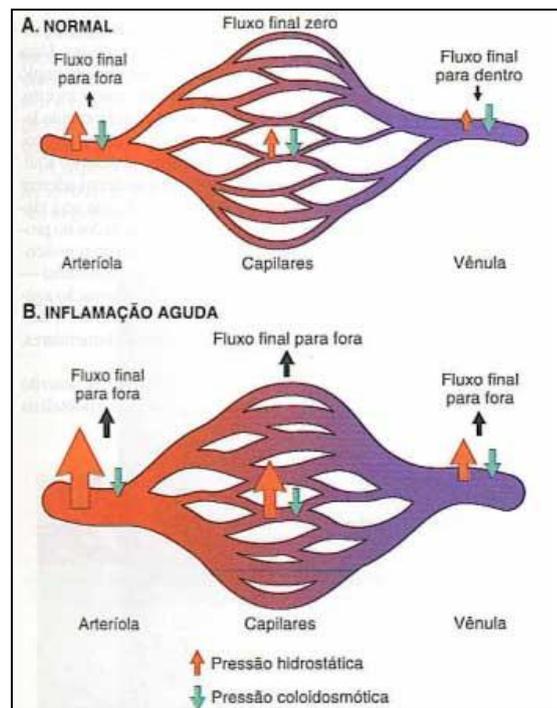


Figura 3.4. Alteração do fluxo sanguíneo associado à inflamação [20].

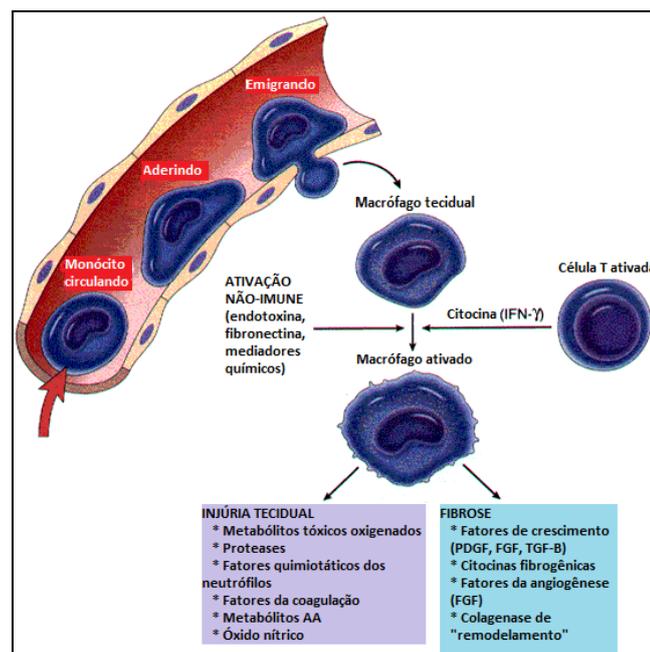


Figura 3.5. Destruição tecidual característica de um processo inflamatório crônico [20].

3.2.2. Reparo Tecidual

A inflamação é uma resposta fisiológica de um tecido vivo que sofreu agressão, que foi perdido ou que foi tratado cirurgicamente. Todo reparo inicia-se através de um processo inflamatório e pode ocorrer tanto por regeneração, quanto por cicatrização [14].

Regeneração é a reprodução ou reconstituição de uma parte danificada ou perdida do tecido, resultando em estruturas com a mesma arquitetura e função das estruturas originais. Já a cicatrização é a reparação de uma ferida por um tecido que não restaura completamente a arquitetura ou a função da parte danificada [14].

3.2.2.1. Reparo ósseo

O processo inflamatório desencadeado por uma injúria ao tecido ósseo (fratura, por exemplo) ou por um defeito cirurgicamente criado, dará início ao processo de reparo ósseo. O perióstio e o endóstio, próximos à área fraturada, respondem com uma intensa proliferação, formando um tecido conjuntivo rico em células osteoprogenitoras que penetra entre as extremidades ósseas rompidas, constituindo o entorno da fratura. Neste anel ou colar conjuntivo, bem como no conjuntivo que se localiza entre as extremidades ósseas fraturadas, surgem tecidos imaturos (Figura 3.6), tanto pela ossificação endocondral de pequenos pedaços de cartilagem, como também por ossificação intramembranosa. Este processo evolui de modo a aparecer a formação de calo ósseo com tecido ósseo primário (Figura 3.6, item 4). O calo ósseo é constituído por tecido imaturo que une provisoriamente a extremidade do osso fraturado [14].

As trações e pressões exercidas sobre o osso, durante a reparação e, após o retorno do indivíduo às suas atividades normais, causam a remodelação do calo ósseo e sua completa substituição por tecido ósseo lamelar ou maduro. Se essas trações e pressões forem idênticas às exercidas sobre o osso antes da fratura, a estrutura dele volta a ser aquela que existia anteriormente [14].

O tecido ósseo exibe um alto potencial de regeneração, porém esta capacidade exibe limitações com defeitos de grandes dimensões. Nestas situações, a utilização de enxertos favorece o processo de reparo através de preenchimento do defeito ósseo que serve como um arcabouço, levando à neoformação óssea, através do processo de osteocondução, onde (em que) os osteoblastos depositam nova matriz óssea aderida às partículas enxertadas [14].

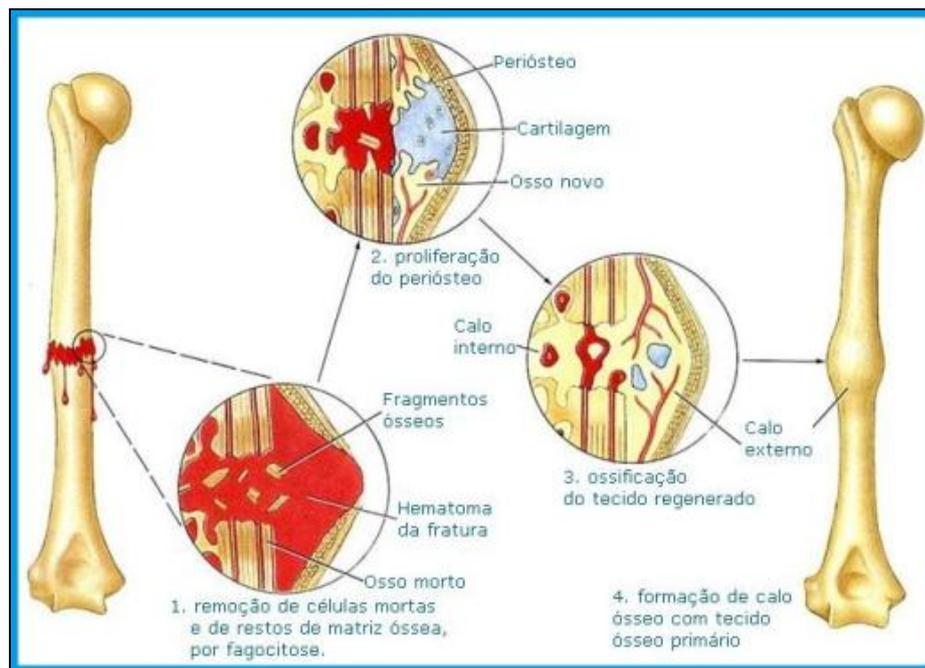


Figura 3.6. Processo de reparo ósseo [23].

3.3. Osseointegração

Foi na década de 60 do século passado, que Brånemark e cols. [3] descobriram, acidentalmente, um mecanismo alternativo de fixação durante um trabalho experimental, realizado na Suécia. Brånemark estudava, através do microscópio vital, uma técnica onde uma fina camada de tecido vivo era preparada e examinada sob microscópio. Para facilitar, ele utilizou um mecanismo óptico, implantado no metal e inserido cirurgicamente no osso de animais experimentais. Câmaras de observação similares tinham sido usadas por outros pesquisadores. No entanto, o inusitado foi que quando o metal titânio era usado na câmara de observação e a peça era introduzida no osso com pequena técnica cirúrgica, o osso aderiu ao metal com grande tenacidade. A estrutura metálica tornava-se incorporada ao osso vivo numa forma

que se imaginava ser impossível. Brånemark compreendeu o significado deste mecanismo de fixação, uma vez que ele permitiu a conexão de componentes protéticos ao esqueleto através de unidades de fixação, não só para implantes dentários, mas também para uso ortopédico [24].

Baseados nestas observações da adesão estrutural e funcional do tecido ósseo ao titânio, o qual Brånemark denominou de fenômeno da “osseointegração”, estudos experimentais foram iniciados objetivando o desenvolvimento e aprimoramento dos implantes endósteos. Os implantes dentários desenvolvidos por Brånemark foram inseridos em pacientes pela primeira vez, em 1965, para a reabilitação de indivíduos totalmente edêntulos, também chamados de “inválidos orais”. O sistema inicial baseou-se em um conceito único de implante, sendo este de titânio puro e liso (usinado), em forma de parafuso e sem a aplicação de qualquer modificação de superfície. Este tipo de implante foi o mais usado para a reposição de dentes e reabilitação dos maxilares, total ou parcialmente, desdentados [24].

A osseointegração ocorre a partir da colocação do implante de titânio dentro de uma loja óssea, confeccionada cirurgicamente. Como descrito anteriormente, este procedimento desencadeia um processo inflamatório, semelhante ao que ocorre nos casos de fratura. O coágulo sanguíneo formado traz consigo células inflamatórias, responsáveis pela liberação de mediadores que, por sua vez, estimulam a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos. Os osteoblastos iniciam a deposição de matriz óssea em íntimo contato com a superfície do implante.

A osseointegração implica em uma dinâmica integração entre osso e titânio que vai se tornar mais madura com a colocação de carga (prótese dentária) sobre o implante, seguindo uma fase de cicatrização inicial na qual o local de sua instalação não é submetido a estresse ou micromovimentação (deslocamento do implante em relação ao osso). Uma micromovimentação prematura interfere no processo de modelagem óssea normal, levando à formação de um tecido de cicatrização fibroso ao redor do implante. Assim, o local de implante já preparado é visto como uma ferida, onde o dano ao tecido deve ser mínimo. Um implante osseointegrado bem sucedido é aquele em que há uma conexão direta entre o osso vivo e o titânio, ou seja, não deve haver uma camada de tecido fibroso envolvendo-o. Esta fixação pode e deve

suportar condições de carga, porque o implante osseointegrado está mais próximo de uma raiz dentária anquilosada do que uma raiz normal [24].

3.4. Implantes

Nos dias de hoje, quase todos os implantes metálicos manufaturados são de titânio em várias formas e de vários tipos de superfície. A utilização de diversos metais na fabricação de implantes dentários tem crescido muito, porém existe uma tendência clara de utilização do titânio por sua grande disponibilidade na natureza e pela sua biocompatibilidade [25].

3.4.1. Titânio

O titânio e suas ligas são amplamente utilizados na fabricação de implantes dentários e ortopédicos, tanto na forma pura como de liga Ti-6Al-4V, pois é considerado quimicamente inerte, possui propriedades mecânicas adequadas e excelente biocompatibilidade. É um metal não-nobre, protegido por uma camada passiva de dióxido de titânio que se forma espontaneamente no ar ou na água [25,26]. Quimicamente, a camada de óxido consiste de vários óxidos (TiO_2 , TiO , TiO_5), porém o TiO_2 predomina. Várias pesquisas histológicas demonstraram a excelente incorporação dos implantes de titânio e o íntimo contato entre a superfície do titânio e o osso perimplantar. Por esta razão, a interface titânio-osso pode transferir com sucesso as forças compressivas e de cisalhamento impostas na cavidade bucal, mas somente se a configuração do implante proporcionar uma adequada retenção mecânica [25,26]. Baseado em estudos ultraestruturais, foi levantada a hipótese de que a camada de óxido nos implantes de titânio é revestida por um fino filme de substâncias fundamentais teciduais. As fibras colágenas do osso circunvizinho foram observadas a uma distância de 20-40 μm deste filme. A malha de filamentos foi gradualmente substituída por feixes de fibrilas colágenas que se entrelaçam com aquelas do osso circunvizinho. Baseado nesse conhecimento, o termo “osseointegração” foi criado para descrever o contato direto entre o osso viável e o implante sem interposição de uma camada de tecido mole [25,27,28].

A degradação do titânio in vivo é mínima, devido à camada protetora de óxido. Entretanto, em alguns casos foi possível demonstrar íons de titânio no osso e na mucosa perimplantar. É difícil interpretar a presença de íons de titânio ou avaliar seu significado médico, pois eles também entram no corpo através dos alimentos [25].

As características especiais do titânio foram de extrema importância para o seu emprego bem-sucedido na indústria de implantes dentários - principalmente a sua resistência à corrosão e a sua facilidade de modelagem em diversas formas, sem perda da resistência e da biocompatibilidade. Porém, algumas circunstâncias são necessárias para o titânio ser rigidamente incorporado ao osso vivo. A superfície do titânio deve estar não só limpa ou estéril; ela deve ser livre de contaminação e num estado reativo. O local do implante ósseo deve ser preparado com grande delicadeza, infligindo um trauma mínimo ao tecido. Uma estreita compatibilidade entre o metal e o osso é importante. Um período de cicatrização atraumático é necessário para o osso crescer e se fundir com a camada de óxido da superfície do implante. Se todas essas circunstâncias necessárias estiverem presentes, então a osseointegração ocorre de forma previsível numa alta porcentagem de casos. Além do mais, quando as condições necessárias estão presentes, o osso vivo tem dificuldade inclusive em reconhecer que o titânio é uma substância estranha ao corpo [24].

3.4.2. Tratamento de Superfícies

Os implantes de titânio foram inicialmente empregados na reabilitação de pacientes totalmente edêntulos. Sua alta taxa de sucesso com os tratamentos, mostrando segurança e previsibilidade em longo prazo, permitiu que seu emprego fosse também aplicado em pacientes, parcialmente desdentados, e também para a reposição unitária de dentes perdidos. Situações extremas, com pouco volume ósseo, também foram contornadas cirurgicamente, através de enxertos, e os implantes passaram a ser utilizados com altas taxas de sobrevivência. No entanto, a crescente demanda por estética e por tratamentos mais rápidos, menos dispendiosos e menos invasivos estimulou o aprimoramento dos implantes. A variabilidade de componentes protéticos, a associação com procedimentos de regeneração óssea guiada, o

desenho e os materiais dos implantes, assim como as inovações no tratamento da superfície do titânio permitiram grandes avanços. Os implantes de titânio de superfície lisa, ou implantes usinados, inicialmente aceitos como a maior inovação na área da Implantodontia, vêm sendo gradualmente substituídos por implantes com os mais variados tratamentos de superfície. Independente do tipo de tratamento de superfície, o objetivo é sempre o de estimular a neoformação óssea nos estágios iniciais da osseointegração, traduzido para uma maior superfície de contato osso-implante. Em termos clínicos, isto implica na possibilidade de carregamento (aplicação de carga através de uma prótese) sobre este implante, em períodos cada vez mais reduzidos.

Atualmente, tem crescido as técnicas de tratamento superficial, podendo influenciar em várias etapas do processo de desenvolvimento e estabelecimento da osseointegração. Isso ocorre tanto nas células presentes na interface osso-implante, como no tipo de osteogênese e na quantidade de matriz óssea calcificada, depositada na superfície do implante [29,30]. O termo interface refere-se à íntima interação existente entre a superfície do implante e os tecidos orgânicos circundantes.

Nos implantes de titânio, os procedimentos usuais de fabricação geram uma camada superficial não uniforme, oxidada e contaminada, a qual se encontra geralmente deformada plasticamente e com tensões internas. Essa camada superficial não é apropriada para aplicações biomédicas, havendo a necessidade de realização de algum tipo de tratamento superficial para melhorar suas superfícies.

Os implantes de titânio com superfícies rugosas têm encontrado ampla utilização na Implantodontia. Elas substituíram as superfícies lisas usinadas em grande escala nas aplicações clínicas, devido à sua capacidade de mostrar o contato osso-implante em um tempo mais curto do que os implantes de superfície lisa, além de uma maior superfície de contato [31].

Em particular, a rugosidade da superfície é um parâmetro que tem sido muito pesquisado, tanto *in vitro* como *in vivo*. As superfícies ásperas, tais como as jateadas com areia de partículas grandes e condicionadas com ácido (SLA) demonstraram serem superiores às superfícies lisas, no que diz respeito ao contato com o osso e ao aumento de ancoragem, ampliando assim o torque de remoção de implan-

tes [26]. Estudos recentes têm demonstrado as vantagens das superfícies incorporadas com cálcio, na cicatrização óssea de implantes microestruturados [32].

3.4.2.1. Plasma-Spray (PSA)

Uma técnica muito utilizada é o revestimento do implante com plasma spray, um termo genérico de um grupo de processos de tratamentos de superfície em que metais cerâmicos e polímeros, na forma de pó, barra ou lâmina são aquecidos em temperatura elevada, lançados contra uma superfície e depositados em camadas. As propriedades do revestimento dependem da técnica de deposição empregada e do material depositado.

Alguns dos implantes de titânio em uso atualmente são revestidos com pó de titânio, formando uma camada no substrato, aplicado com uma técnica especial de plasma spray. Esta técnica cria uma rugosidade e também aumenta a superfície do corpo do implante [25,28]. O revestimento tem como objetivo melhorar a resistência ao desgaste, a resistência mecânica e proteger contra a corrosão da superfície do substrato. Além disso, esta técnica tem ampla aplicação e contínuo aperfeiçoamento, devido aos bons resultados de aderência, eficiência e qualidade do revestimento.

A técnica envolve forçar um gás nobre que é dividido em íons e elétrons (plasma), por meio de um arco intensamente aquecido (15.000-20.000°C), a uma velocidade muito alta. O material de revestimento (partículas de pó de titânio na forma de hidreto de titânio) é colocado no spray de gás, extremamente quente usando argônio. O hidreto se decompõe no vapor do gás quente e pequenas gotículas de metal são projetadas no corpo do implante que está a uma distância de 15-20 cm. Assim, as partículas de titânio exibindo o tamanho de 50-100 μm soldam-se firmemente ao corpo do implante, através desta técnica do spray de plasma (figura 3.7) [25].

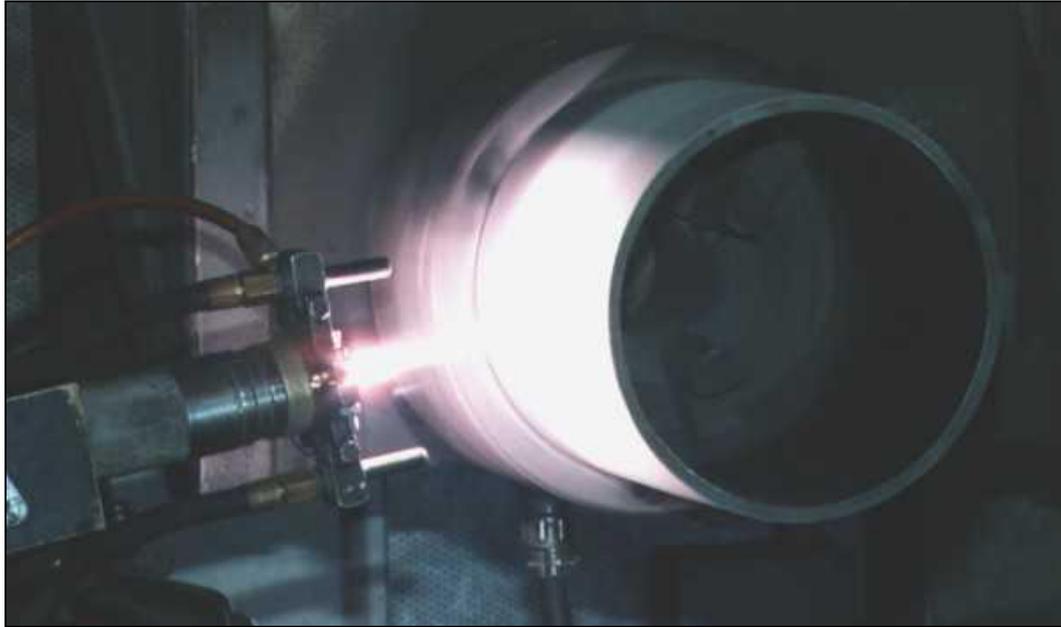


Figura 3.7. Processo de tratamento de superfície plasma-spray.

Paredes e cols. (2006) avaliaram que alterações na superfície, obtida pelo recobrimento de implantes com gases ionizados por aspensão térmica com plasma spray de titânio aumentam a área de contato superficial, proporcionando uma maior osseointegração. Estas alterações morfológicas da superfície aceleram a absorção do sangue, pela ação do efeito da molhabilidade, garantindo o processo de osseointegração [32].

3.4.2.2. Nanotexturização

A palavra "nanotecnologia" foi utilizada pela primeira vez pelo professor Norio Taniguchi, em 1974, para descrever as tecnologias que permitiam a construção de materiais a uma escala de 1 nanômetro. A nanotecnologia é o estudo de manipulação da matéria, numa escala atômica e molecular [33]. Geralmente é lida com estruturas de medidas entre 1 a 100 nanômetros, em ao menos uma dimensão e inclui o desenvolvimento de materiais ou componentes. Além disso, está associada a diversas áreas (como a medicina, eletrônica, ciência da computação, física, química, biologia e engenharia dos materiais) de pesquisa e produção na escala nano (escala atômica). O princípio básico da nanotecnologia é a construção de estruturas e novos materiais a partir dos átomos (os tijolos básicos da natureza).

A nanotecnologia é a capacidade potencial de criar coisas a partir do menor elemento, usando as técnicas e ferramentas para colocar cada átomo e cada molécula no lugar desejado. O objetivo principal não é chegar a um controle preciso e individual dos átomos, mas elaborar estruturas estáveis com eles. No momento em que este sistema de engenharia molecular for alcançado, o resultado será uma nova revolução industrial. Assim, a nanotecnologia seria responsável por importantes modificações econômicas, sociais, ambientais e militares.

O uso de materiais, cujo tamanho de partículas é reduzido a níveis inferiores a 100 nm, tem sido cada vez mais considerado como capaz de explorar propriedades novas ou significativamente alteradas no campo da ortopedia ou dos materiais dentários [34]. Nanomateriais apresentam um aumento do número de átomos, partículas ou porosidades nas superfícies, uma maior área de superfície e uma alteração na distribuição de elétrons, se comparados aos materiais convencionais, fazendo com que fiquem mais reativos que os materiais convencionais [33]. Embora a confecção de materiais para substituir osso e partes perdidas do corpo não seja recente, a utilização de materiais nano-estruturados em relação aos materiais convencionais é relativamente nova, por apresentar melhores propriedades superficiais (quando comparados aos convencionais).

As tendências atuais levaram também ao emprego da nanotecnologia no tratamento dos substratos de titânio liso ou rugoso dos implantes dentários, nos quais o desenvolvimento de superfícies nano-estruturadas pode aumentar, consideravelmente, a adesão de células ósseas e também a produção de matriz óssea, necessária no processo de mineralização e manutenção do osso que circunda o implante [35]. Apesar de haver conhecimento sobre as vantagens das superfícies nanoestruturadas, poucos sistemas de implantes dentários osseointegrados, disponíveis comercialmente no mercado, têm utilizado essa tecnologia na elaboração de seus produtos [34].

Diferentes técnicas de nanotexturização de implantes dentários de titânio têm sido propostas, como a deposição discreta de nanopartículas de hidroxiapatita [34, 35,37], o revestimento com filmes finos nanométricos de óxido de titânio (forma cristalina anatase ou rutilo), óxido de alumínio ou óxido de zircônio [33], o tratamento

com nanoestruturas de fluoreto [36] e titânia [37] e a deposição de cristais de fosfato de cálcio nanométricos [38].

A influência *in vitro* de nanoestruturas na atividade celular tem sido demonstrada com diferentes tipos celulares, o que pode indicar que a nanotexturização pode modular a formação tecidual final [35,39]. Além disso, evidências pré-clínicas [33,34,35,36,37] e em humanos [38] recentes apontam para uma alteração na resposta óssea precoce [33,34,36]: uma maior tendência de osteogênese, confirmada através da expressão dos genes específicos da cascata de diferenciação de osteoblastos [33], uma alteração da composição química da interface osso-implante [33,36], uma maior área de contato osso-implante [33,36,37,38], além de uma maior carga de ruptura [34] e um maior torque de remoção do implante (maior ancoragem óssea) [33,36].

Em um ensaio clínico randomizado, Goéne e cols. (2007) fizeram a colocação de implantes experimentais, ora com superfície, duplamente condicionada com ácido (DCA, Osseotite®, BIOMET/3I) (n = 9); ora com superfície DCA, acrescida de nano-partículas de fosfato de cálcio (Nanotite®, BIOMET/3I) (n = 9), na região posterior dos maxilares de pacientes com o objetivo de avaliar a taxa e a extensão da neoformação óssea. Nove pares de implantes foram colocados e removidos com brocas trefinas, após 4 ou 8 semanas de cicatrização, livre de qualquer tipo de carregamento. A quantidade de osso em contato linear (%) com a superfície do implante foi utilizada para determinar o potencial osteocondutor da superfície do implante. Os implantes e os tecidos adjacentes foram processados para análise histológica, a qual revelou um valor de contato osso-implante médio para a superfície teste (Nanotite), significativamente maior do que os implantes controle (Osseotite) em ambos os intervalos de tempo. Os autores concluíram que a adição de um tratamento com fosfato de cálcio, em uma escala nanométrica sobre uma superfície de implante, duplamente condicionada com ácido (DCA) pareceu aumentar a extensão do crescimento ósseo, após 4 e 8 semanas de cicatrização.

3.5. Hormônio do Crescimento

O hormônio do crescimento recombinante humano (rhGH – *recombinant human Growth Hormone*) é um hormônio à base de proteínas que estimula o crescimento corpóreo, particularmente o crescimento dos ossos longos, promovendo a proliferação de células cartilaginosas nas epífises. Estudos pré-clínicos mostraram que a hipofisectomia de animais ocasiona a cessação do crescimento, que pode ser restabelecida pela administração do hormônio. O hormônio do crescimento é um aminoácido 191, polipeptídeo de cadeia única que é sintetizado, armazenado e secretado pelas células somatotróficas. Somatotrofina refere-se ao hormônio do crescimento, produzido naturalmente em animais, enquanto que o termo recombinante se refere à somatotrofina hormonal do crescimento, produzido por tecnologia de DNA [4,33].

Devido a restrições para a obtenção do rhGH até os anos 80 do século passado, um limitado número de estudos foi realizado até aquele período e eram caracterizados pela não homogeneidade do tratamento e dos grupos controles, diferentes fontes de hormônio e grupos e idades de animais insuficientes. Entretanto, a partir dos anos 90, através de técnicas de biologia molecular, a síntese laboratorial do hormônio do crescimento humano recombinante se tornou realidade e houve um significativo aumento no número e na qualidade das pesquisas, envolvendo este hormônio. No princípio, o rhGH foi utilizado em crianças com retardo do crescimento por deficiência na secreção do rhGH pela adenohipófise. Atualmente, está bem estabelecido também o importante papel do rhGH em adultos [40,41].

Dentre as principais ações metabólicas do rhGH destaca-se o aumento do anabolismo de proteínas, do catabolismo de ácidos graxos e a redução da utilização de glicose como fonte de energia; assim, este hormônio é um poupador de aminoácidos. No tecido ósseo, observa-se que a sua ação promove a deposição aumentada de proteínas pelos condrócitos e osteoblastos, aumento do número de mitoses e a conversão de condrócitos em osteoblastos [40,42,43,44].

O rhGH é um regulador fundamental do crescimento ósseo pós-natal e atua no remodelamento ósseo (balanço entre a reabsorção e a formação óssea). Ainda,

o rhGH exerce um papel fundamental sobre os osteoclastos e mais acentuadamente sobre os osteoblastos, criando a base teórica para o seu possível efeito de anabolismo no esqueleto. Em virtude disso, o hormônio do crescimento pode atuar tanto como osteoindutor tópico, aplicado diretamente na loja óssea ou na superfície dos implantes, ou se difundindo sistemicamente, aumentando o anabolismo do tecido ósseo no organismo [45,46].

3.6. Métodos para Caracterização de Superfície

3.6.1. Imagem (MEV e MO)

O microscópio ótico (MO) é um instrumento aparentemente simples, sendo essencialmente uma extensão de nossos próprios olhos. Ele amplia pequenos objetos e nos permite visualizar diretamente as estruturas que estão abaixo do poder de resolução do olho humano (0,1 mm). Há tanta diferença entre materiais em nível microscópico como existe no nível macroscópico, e a prática da microscopia envolve aprender as características microscópicas de materiais [47].

O microscópio ótico é composto de no mínimo duas lentes convergentes: a primeira está próxima ao objeto, denominada lente objetiva (grande distância focal); e a segunda, é uma lupa denominada ocular (pequena distância focal). Os microscópios óticos ficam, então, limitados a um aumento máximo de 2.000x, pois acima deste valor os detalhes menores que o comprimento de onda da luz empregada (4.000 - 7.000 Å) são imperceptíveis. Deste modo, para aumentar a resolução, a fim de se obter a imagem desejada, seria necessário trabalhar-se com comprimento de onda menor, o que acontece com o microscópio eletrônico [47].

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) utiliza, como meio de formação da imagem, um feixe de elétrons oriundo de um filamento de tungstênio. O feixe é acelerado através de uma diferença de potencial. Durante todo o caminho dos elétrons, que é feito em ambiente controlado a vácuo (10^{-3} Pa), o feixe eletrônico atravessa um sistema de lentes eletromagnéticas, diafragmas e bobinas, incidindo na câmara que contém a amostra, varrendo sua superfície [48].

Nessa interação feixe eletrônico-amostra, são emitidos sinais que devem ser detectados e amplificados de maneira segura, com a menor perda possível de informação. Os sinais são emitidos na forma de elétrons secundários retroespalhados, absorvidos, transmitidos, difratados, entre outros, e de fótons. A captura dos sinais é realizada através da interação com detectores apropriados, sendo amplificados e processados em um sistema analisador, específico para cada tipo de sinal [47].

O MEV permite a captação de imagens amplificadas com aparência tridimensional e que apresentam resoluções de até 0,5 nm, com excelente profundidade de foco. Muitas imagens biológicas podem ser adquiridas por esse método. Porém, a utilização de um tratamento prévio é essencial para obtenção de resultados semelhantes à realidade. O MEV é uma técnica, altamente difundida e conhecida, para a obtenção de imagens com maiores magnificações do que as obtidas em microscopia óptica. Os microscópios eletrônicos apresentam maiores resoluções espaciais e profundidade de foco das imagens, em relação aos microscópios ópticos, devido ao uso de um feixe incidente de elétrons [47].

A técnica de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) é muito utilizada, conjuntamente ao MEV, devido à possibilidade de ambos os equipamentos serem montados juntos. Utilizando os dois métodos, não apenas a aquisição da imagem da amostra pode ser obtida mas também a composição química em áreas na ordem de micrômetros [47,48].

As informações qualitativas e quantitativas sobre os elementos presentes são obtidas pela captação dos raios X característicos, resultantes da interação do feixe primário com a amostra. A análise química da amostra é dada em um espectro, criado a partir da energia dos raios X detectados e é convertida em contagem eletrônica, através de um analisador multicanal. O espectro pode então ser observado, indicando a composição química da amostra [47].

3.6.2. Composição por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica consiste em incidir radiação eletromagnética, correspondente à faixa do infravermelho ($4.000-400\text{cm}^{-1}$) na amostra. A energia associada a estes comprimentos de onda, uma vez absorvida pela molécula, converte-se em energia de rotação-vibração molecular [49].

Este fenômeno de absorção é extremamente quantizado e altamente dependente dos grupamentos químicos que estão presentes na amostra, demonstrando, assim, sua estrutura. A radiação infravermelha não possui energia suficiente para que sua absorção altere o nível energético da molécula, e por isso a técnica espectroscópica utilizada é de absorção, sendo que o sinal analisado será o transmitido ou o refletido, a depender do equipamento utilizado e do material analisado [50].

O espectro de infravermelho (FTIR) é utilizado para verificar as alterações químicas e estruturais, promovidas por irradiação a laser em diferentes densidades de energia no osso, sendo capaz de detectar compostos orgânicos com o aumento de densidade de energia. Permite avaliar, assim, a composição química nos tecidos [51].

3.6.3. Avaliação da Qualidade do Osso Neoformado: Teste Biomecânico de Tração (Pull-out)

O pull-out é um ensaio de resistência à tração mecânica que consiste em submeter um material a um esforço que tende a alongá-lo, geralmente até a sua ruptura (tensão máxima de ruptura), com o propósito de determinar uma ou mais de suas propriedades mecânicas. Esse ensaio deve ser realizado à temperatura ambiente, entre 10 e 35 °C. Através do ensaio de tração, obtém-se a relação da tensão aplicada com a deformação do material [15,33]. O ensaio de pull-out fornece resultados mais precisos para a avaliação do tratamento superficial em testes in vivo, em comparação com os testes mecânicos, usualmente empregados, como contra-torque e torque de remoção; uma vez que a força de ligação química entre o osso e

o implante pode ser medida diretamente, minimizando os efeitos de fricção e de forças mecânicas (como forças de cisalhamento e retenção mecânica), introduzidas pelo formato do implante e por sua rugosidade superficial [15,33,52,53,54].

3.7. Técnicas Histológicas

As técnicas tradicionais para a análise histológica incluem a histomorfologia e a histomorfometria. A primeira utiliza geralmente o microscópio óptico que é examinado por transparência, onde, na maioria das vezes, precisa ser reduzida a cortes finos. Estes são feitos com um instrumento denominado micrótomo, fornecendo uma descrição qualitativa dos tecidos. A segunda, por sua vez, utiliza recursos auxiliares como programas de computador e permite a análise quantitativa, ou seja, uma análise expressa em termos de porcentagem da constituição dos tecidos. Para que possam ser executadas, ambas utilizam métodos de preparação e coloração dos tecidos. A mais utilizada é o método hematoxilina-eosina (HE), considerado o padrão-ouro para a análise histológica dos tecidos.

No método de HE o objetivo é levar ao microscópio um preparado histológico, no qual os tecidos estejam perfeitamente preservados, apresentando a mesma estrutura e composição química que possuíam quando vivos. Mas, apesar dos cuidados tomados, esse ideal não é alcançado, observando-se em todos os preparados histológicos certos artefatos consequentes ao processamento que sofreram. Para vencer esta limitação, são empregados corantes, que coram os componentes celulares com certa especificidade. No entanto, como a maioria dos corantes é tóxica, as células vivas não conseguem resistir a eles. Por este motivo, antes de serem corados, os tecidos são fixados, incluídos e cortados [21].

A fixação é a morte celular, através de procedimentos que produzem a menor distorção possível da célula e da matriz extracelular. Após a fixação, os tecidos são incluídos em materiais dotados de certa consistência, como a resina ou a parafina e cortados em fatias muito delgadas, capazes de serem atravessadas pela luz [21].

A maioria dos tecidos é incolor, o que torna difícil sua observação ao microscópio óptico. Devido a isso, foram introduzidos métodos para a coloração dos tecidos, de modo a tornar seus componentes visíveis e destacados uns dos outros. A maioria dos corantes usados em histologia comporta-se como ácidos ou bases e tende a formar ligações salinas com radicais ionizáveis, presentes nos tecidos. Os componentes dos tecidos que se coram com corantes básicos são chamados basófilos, sendo chamados de acidófilos os que se ligam a corantes ácidos. O azul-de-toluidina e o azul-de-metileno são exemplos de corantes básicos. A hematoxilina comporta-se como um corante básico, ligando-se às estruturas basófilas dos tecidos. Os núcleos celulares, por serem ricos em DNA, coram-se pelos corantes básicos. Os corantes ácidos, tais como o orange G, a eosina e a fucsina ácida, coram principalmente as proteínas citoplasmáticas. A hematoxilina cora em azul os núcleos celulares e outras estruturas de natureza ácida (basófilas), como as regiões do citoplasma ricas em RNA. Em contraste, a eosina cora o citoplasma e o colágeno do material extracelular em diversas tonalidades do vermelho [21].

O método picro-sirius utiliza o corante denominado vermelho sirius, um forte corante aniônico hidrofílico, o qual mancha o colágeno pela reação dos seus grupos de ácido sulfônico com os grupos básicos, presentes na molécula de colágeno. As moléculas de corante alongadas estão ligadas às fibras de colágeno, de tal forma que os seus longos eixos ficam paralelos. Esta relação paralela entre o corante e o colágeno resulta em uma birrefringência reforçada. O exame de secções de tecido, a partir de 15 espécies de vertebrados sugere que a coloração com vermelho sirius, quando combinada com o reforço da birrefringência, pode ser considerada específica para o colágeno, sendo capaz de distinguir, inclusive, o colágeno tipo I do tipo III [55].

No entanto, uma limitação característica deste método na avaliação da neoformação óssea ao redor de implantes dentários consiste na necessidade de descalcificação do tecido ósseo, dissolvendo a parte mineral. Além disso, a dificuldade de obtenção de biópsias, estruturalmente íntegras com o implante, o tecido ósseo adjacente e a interface osso-implante inviabiliza o processamento das amostras e a consequente análise histológica.

3.8. Testes *in-vivo*

Até o momento, não existe nenhum estudo avaliando, *in vivo*, o efeito da nanotexturização de superfícies de implantes de titânio, associado ao hormônio do crescimento, nos diferentes estágios da osseointegração.

De acordo com Eldein e cols. (2011) [56], o hormônio do crescimento aumenta a neoformação óssea ao redor dos implantes de titânio no estágio inicial da osseointegração. Em um estudo pré-clínico de boca dividida, os autores utilizaram seis cães que tiveram os primeiros pré-molares inferiores dos lados direito e esquerdo extraídos. No lado direito, foi feita a colocação imediata dos implantes nos alvéolos pós-extração apenas como controle, enquanto que no lado esquerdo, o hormônio do crescimento (GH) foi colocado na cavidade, seguido da colocação do implante (grupo teste). Os animais foram sacrificados em 2, 6 e 12 semanas, após a cirurgia, e as amostras preparadas pelos métodos HE (hematoxilina-eosina) e corante tricrômico para análise histológica do osso recém-formado. Os resultados mostraram que a neoformação óssea ocorreu nos dois grupos, porém no grupo que tinha o GH (teste), foi observada uma maior densidade óssea e as fibras colágenas eram mais densas e melhor orientadas. Além disso, o grupo teste mostrou que, nas primeiras fases da reparação óssea, os osteons e os sistemas de harvers eram mais organizados. Os autores concluíram que o uso de pó do GH ao redor dos implantes dentários, colocados imediatamente em alvéolos pós-extração, intensificou a resposta do osso periimplantar.

Meirelles e cols. (2008) [36] investigaram o efeito de implantes, quimicamente modificados e com diferentes nanotopografias, nos diferentes estágios da osseointegração. Quarenta implantes com diferentes tratamentos de superfície - jateadas com TiO_2 (1), acrescidas de tratamento com fluoreto (2) ou modificadas com nanohidroxiapatita (3) foram utilizados em dez coelhos brancos da raça Nova Zelândia. A avaliação da superfície incluiu a análise topográfica com interferometria, análise morfológica com microscopia eletrônica de varredura e análise química com espectrometria fotoeletrônica de raio X. A resposta óssea foi investigada com o teste de torque de remoção, enquanto que a análise histológica foi conduzida após um período de cicatrização de 4 semanas. Os parâmetros de rugosidade de superfície mos-

traram uma ligeira redução do desvio médio de altura para os implantes tratados com fluoretos (2), comparados aos jateados com TiO_2 (1) (controle) e aos tratados com nano-hidroxiapatita (3). As imagens de microscopia eletrônica de varredura em alta magnificação indicaram a presença de nanoestruturas nos implantes, quimicamente modificados. A análise química revelou a presença de titânio, oxigênio, carbono e nitrogênio em todos os implantes. O grupo tratado com fluoreto revelou fluoreto e o grupo tratado com nano-hidroxiapatita revelou cálcio e fósforo com uma redução simultânea de titânio e oxigênio. Os valores de torque de remoção revelaram uma retenção aumentada para os implantes, quimicamente modificados, que exibiam uma nanotopografia específica. A análise histológica demonstrou uma formação óssea imatura em contato com a superfície do implante em todos os grupos, de acordo com o tempo de cicatrização do experimento. Os autores concluíram que as modificações químicas usadas foram capazes de produzir uma nanotopografia particular, e junto com os íons presentes na superfície do implante, podem explicar os valores de torque de remoção aumentados depois de um período de cicatrização de quatro semanas.

Nesse contexto, é fundamental o desenvolvimento e a experimentação de superfícies de implantes que possam acelerar e estabilizar a longo prazo a osseointegração dos implantes dentais. Embora estudos recentes com animais de laboratório tenham utilizado o rhGH no reparo ósseo associados a implantes, não existem evidências mostrando o efeito desta substância associada à nanotexturização da superfície do implante. Por isso, o objetivo deste estudo é avaliar, através de uma nova técnica de caracterização das amostras, a influência do uso de superfícies nanotexturizadas no processo de osseointegração de implantes de titânio.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fabricação e Preparação dos Implantes

Os implantes foram fabricados a partir do titânio, comercialmente puro (ASTM Grau 2) e fornecido pela empresa Baumer® S.A. Foram usinados 40 implantes em formato cilíndrico, liso e sem roscas, com diâmetro de 2,2 mm e comprimento de 6 mm (28 para os testes in vivo e 12 para os testes preliminares). As amostras foram atacadas por uma solução de ácido fluorídrico (HF) a 10% para remoção da camada de óxido nativo e imediatamente revestidas, através da pulverização de uma camada de 100µm de partículas de plasma spray atmosférico (PSA). A seguir, os implantes foram separados em dois grupos com 20 implantes cada: superfície tratada apenas com plasma spray de titânio, conforme a figura 4.2(a) e superfície PSA nanotexturizada, conforme a figura 4.2 (b).

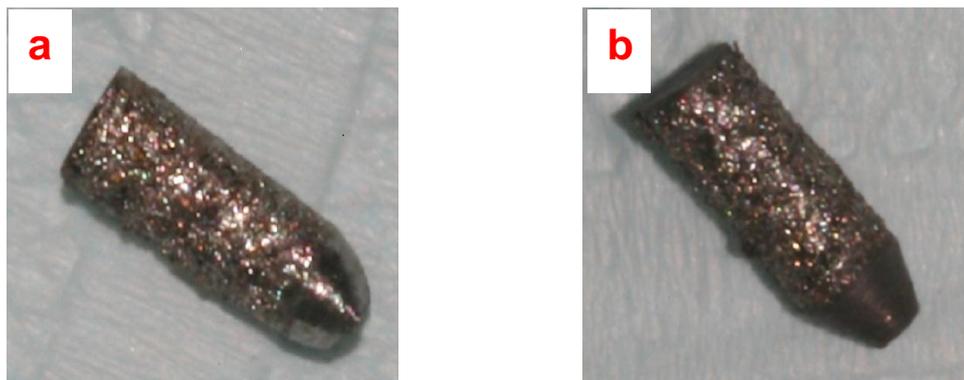


Figura 4.1. Implante de titânio plasma-spray (a) e implante plasma-spray nanotexturizado (b).

A deposição PSA foi feita pela empresa Baumer S.A. e o processo de nanotexturização foi, especialmente, realizado para este experimento em sala limpa com certificação P4, no Laboratório de Materiais e Nanociências do Grupo de Estudos e Propriedades de Superfícies e Interfaces, do Centro de P&D em Física da Faculda-

de Física da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (LMN/GEPSI/PUCRS). Após a confecção e tratamento da superfície, os implantes tiveram suas áreas limpas a vácuo, para então serem embalados individualmente, em papel grau cirúrgico e esterilizados com óxido de etileno.

4.2. Fase Experimental

Este trabalho caracterizou-se como um estudo experimental *in vivo* e foi submetido à apreciação e aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) (protocolo 10/00165) (ANEXO 1). Cabe salientar que foi conduzido sob a supervisão do Serviço Veterinário da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), cujo número de protocolo é 13.810. A pesquisa foi realizada de acordo com os princípios éticos vigentes para o uso de animais de laboratório, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e prosseguiu em ambiente regido pelas regras da Lei Arouca (nº 11.794, de 8 de outubro de 2008).

A metodologia utilizada neste trabalho baseou-se em um projeto piloto (ANEXO 2) que contou com a colaboração do Professor Doutor Rogério Miranda Pagnoncelli e o Doutor Marcelo Emir Abreu. Inicialmente, três implantes foram colocados na tíbia de um coelho: 1 (um) implante nanotexturizado (PSA-nano), 1 (um) implante com superfície plasma-spray (PSA) e 1 (um) implante liso usinado. A figura 4.1 mostra que, após 30 dias, no implante PSA-nano o calo ósseo formado ao redor foi visivelmente maior que no implante adjacente, sem a nanotexturização. Em virtude disso, resolvemos utilizar neste projeto o implante plasma-spray (PSA) e o implante nanotexturizado.

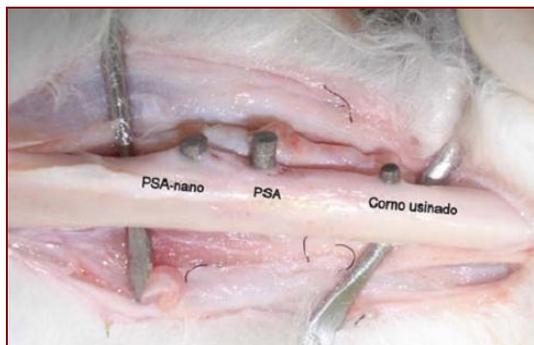


Figura 4.2. Fotografia da tíbia do coelho mostrando os implantes PSA-nano, PSA e liso.

4.3. Composição dos Grupos Experimentais

Ao todo confeccionaram-se vinte e quatro (24) implantes. As amostras foram randomicamente alocadas em 8 grupos, de acordo com o tipo de tratamento de superfície (Grupo I = implantes PSA; Grupo II = implantes PSA-nano), a associação ou não com o hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) (C = controle; H = presença do hormônio) e os diferentes períodos observacionais (14 ou 42 dias) (Tabela 4.1). Em todos os animais, os implantes PSA e PSA-Nano foram alocados nas cavidades experimentais proximal e distal da tíbia, respectivamente.

Tabela 4.1. Composição dos grupos experimentais (I = Grupo I - implantes PSA; II = Grupo II implantes PSA-nano; C = ausência do hormônio do crescimento ou controle; H = presença do hormônio ou teste; 14d = 14 dias de cicatrização; 42d = 42 dias de acompanhamento).

Grupos	Subdivisão dos Grupos	Tempo de Cicatrização	Presença do Hormônio	Número de Implantes
Grupos I Implantes PSA	IC14(PSA14d)	14D	Sem	Implante IC14-1
				Implante IC14-2
				Implante IC14-3
	IC42(PSA42d)	42D	Sem	Implante IC42-1
				Implante IC42-2
				Implante IC42-3
	IH14 (PSA- H14d)	14D	Com	Implante IH14-1
				Implante IH14-2
				Implante IH14-3
	IH42(PSA- H42d)	42D	Com	Implante IH42-1
				Implante IH42-2
				Implante IH42-3
Grupo II Implantes PSA-Nano	IIC14 (PSA-nano14d)	14D	Sem	Implante IIC14-1
				Implante IIC14-2
				Implante IIC14-3
	IIC42 (PSA-nano42d)	42D	Sem	Implante IIC42-1
				Implante IIC42-2
				Implante IIC42-3
	IIH14(PSA-nano- H14d)	14D	Com	Implante IIH14-1
				Implante IIH14-2
				Implante IIH14-3
	IIH42(PSA-nano- H42d)	42D	Com	Implante IIH42-1
				Implante IIH42-2
				Implante IIH42-3

O estabelecimento de dois períodos de observação permitiu a avaliação dos efeitos do hormônio do crescimento em diferentes estágios da osseointegração – aos 14 dias, correspondendo ao estágio inicial (ou estabilidade primária), que é quando ocorre a maior prevalência de perda de implantes; e aos 42 dias, correspondendo ao estágio final (ou estabilidade secundária), momento este que, em humanos, corresponde ao momento de aplicação da carga (prótese) sobre o implante.

4.4. Cálculo da amostra

O cálculo do tamanho da amostra do grupo experimental foi definido a partir da realização de um cálculo amostral (WINPEPI®, módulo compare 2, versão 1.47) [57]. Considerou-se um nível de significância de 0.05, um poder de 80% e uma razão de 1:1 (com a presença rhGH: sem a presença rhGH), para poder se detectar uma diferença, clinicamente relevante de dois desvios-padrão. O tamanho da amostra obtido foi de 14 animais, sendo o experimento composto de sete animais em cada grupo. Estudos [58, 59,60] que avaliaram o uso do rhGH na osseointegração de implantes em coelhos também utilizaram 12 animais divididos em 2 grupos (teste e controle) de 6 animais cada, realizaram histomorfometria da região periimplantar, obtendo resultados com significância estatística ($p < 0.05$). Também há estudos [60,61] realizados em cães nos quais foram testados, além do hormônio do crescimento, outros fatores osseoindutores na osseointegração de implantes e cicatrização de defeitos ósseos, em que o número de animais utilizado foi de oito, sendo quatro em cada grupo (controle:teste), submeteram os espécimes à análise histomorfométrica, radiográfica e biomecânica e obtiveram resultados com significância estatística ($p < 0.01$) em alguns testes [57].

4.5. Modelo Experimental em Animal e Procedimento Cirúrgico

Quatorze (14) coelhos machos adultos da linhagem Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), variedade branco, com 10 meses de vida, saudáveis, com ausência de ferimentos e alterações congênitas, obtidos comercialmente do mesmo criador (Biotério da Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC, Brasil) foram utili-

zados como modelo experimental. Os animais foram identificados individualmente de acordo com os grupos e alojados em gaiolas separadas [57].

Os coelhos foram mantidos em local adequado, no biotério situado no Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), em Lages (Santa Catarina), alimentados com ração standard e água filtrada ad libitum. Os instrumentais e materiais descartáveis utilizados na execução deste estudo foram providos pelos pesquisadores e obtidos, através de auxílio financeiro de agências de fomento à pesquisa [57].

Todos os animais foram pesados antes das cirurgias. A média de peso dos animais tratados com rhGH foi de 3,281 kg e a do grupo controle foi de 2,735 kg. Os animais receberam inicialmente medicação pré-anestésica com acepromazina, na dose de 4 mg/Kg associada com butorfanol 0,2 mg/kg via intramuscular. A indução anestésica e manutenção foram realizadas com Ketamina na dose de 50 mg/kg de peso corporal associado a Diazepan por via intravenosa. Profilaxia antibiótica perioperativa, consistindo de 20 mg/kg de amoxicilina, associada a 5 mg/kg de clavulanat foi instituída a todos os animais. As anestésias gerais foram realizadas por Veterinários Anestesiologistas da UDESC.

Após confirmada a anestesia, a pata traseira esquerda foi tricotomizada e infiltrada com anestésico local tipo lidocaína 2% com concentração de 1:150.000 de adrenalina (Lidocaína, DFL®, Rio de Janeiro, Brasil), na região anterior da tíbia, para diminuir o sangramento trans-operatório e controle profilático da dor pós-operatória. A cirurgia foi realizada sob condições assépticas. Uma incisão de aproximadamente 4 cm foi realizada na pele sobre a face anterior da tíbia. Em seguida, o tecido muscular foi divulsionado até atingir o perióstio, que foi incisado e descolado expondo-se o tecido ósseo. Foram feitas na tíbia duas lojas ósseas de 2,2 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade, separadas 16 mm entre elas (Figura 4.2). As cavidades foram confeccionadas com uma fresa cirúrgica helicoidal de 2 mm de diâmetro (Colosso®, Itú, Brasil) em 637 rotações por minuto, sob irrigação abundante de soro fisiológico 0,9%, até o rompimento da cortical óssea. Na sequência, a cavidade foi alargada até o diâmetro e profundidade planejados com uma fresa cirúrgica

helicoidal de 2,2 mm de diâmetro (Straumann Dental Implant System®, Waldenburg, Suíça).

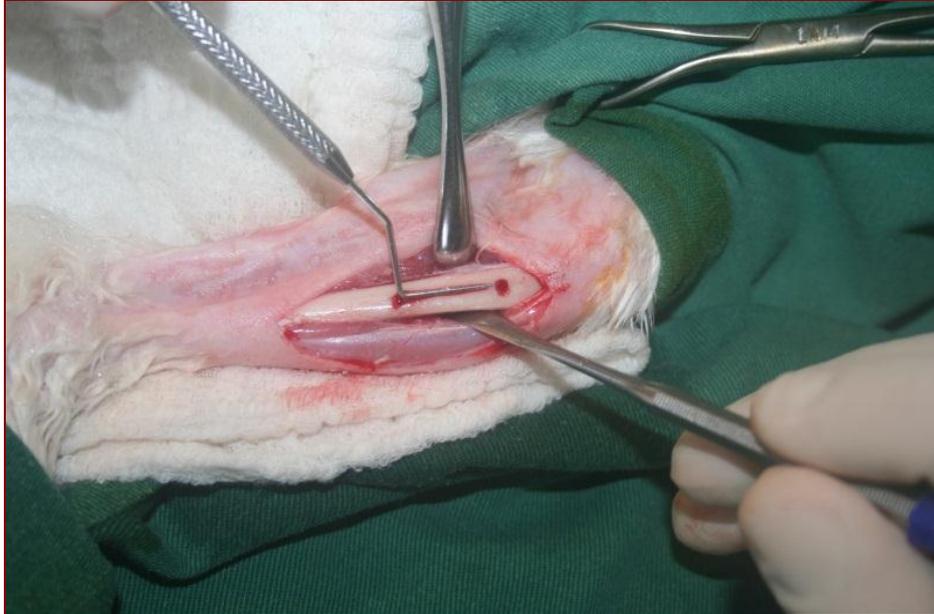


Figura 4.3. Duas cavidades ósseas de 2,2 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade foram confeccionadas, separadas 16 mm entre si.

Cada tíbia esquerda recebeu dois implantes cilíndricos de titânio puro com 2,2 mm e 6 mm de comprimento, sem roscas e com afilamento no último milímetro de sua porção apical, sendo um plasma-spray (proximal) e o outro plasma-spray nano (distal).

Os coelhos foram divididos em grupos. No grupo teste, antes da colocação do implante, em cada defeito ósseo, cirurgicamente criado, foi inserida uma camada de 1 IU (0,3 mg) de rhGH liofilizado (Saizen®, Serono Laboratories, Aubonne, Suíça). Nada foi aplicado nos animais do grupo controle.

Após essa etapa, os implantes foram inseridos 4 mm intraósseos, deixando os 2 mm remanescentes supraósseos para facilitar sua posterior localização e realização do teste biomecânico (pull-out). Procedeu-se então à sutura dos tecidos moles em planos, onde foi utilizada fio de mononylon não-reabsorvível 6.0 (Ethicon®, Johnson & Johnson Co., EUA). Após a sutura, os animais voltaram às suas gaiolas individuais, onde ficaram por um período de sete dias com o objetivo de restringir

sua movimentação pós-operatória. Pelo mesmo período, para evitar infecções, foi utilizado antibiótico (amoxicilina 10 mg/kg e clavulanato 2,5 mg/kg), na água colocada para os animais beberem. A analgesia pós-operatória também foi realizada por via oral, na água dada aos animais por 3 dias (cetoprofeno). Os animais eram visitados duas vezes ao dia, e as feridas operatórias inspecionadas diariamente, durante todo o período do estudo. As suturas da pele foram removidas aos 10 dias de pós-operatório. Após os 14 e 42 dias, os animais foram sacrificados com uma overdose de Ketamina também pela equipe de Veterinários Anestesiologistas do CAV. As tíbias dos coelhos foram dissecadas, removidas e armazenadas em formol.

4.6. Preparação do Corpo de Prova

Os três implantes de cada grupo foram submetidos a três diferentes análises. O primeiro foi analisado por histologia tradicional (método H.E.); enquanto que o segundo foi analisado por testes de microscopia óptica (M.O.), microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.) e microscopia de infra-vermelho (FTIR) e, por último, o terceiro pelo testes mecânico de tração (pull-out) e pela análise do espectro de dispersão de energia (EDS) (Tabela 4.2).

4.6.1. Histomorfologia (Método HE)

Um implante de cada grupo (IC14-1, IC42-1, IH14-1, IH42-1, IIC14-1, IIC42-1, IIH14-1, IIH42-1) foi removido da tíbia, por descalcificação em solução ácida, para que se procedesse à análise histológica do tecido periimplantar, totalizando 8 (oito) implantes. As áreas periimplantares foram então desidratadas em séries crescentes de álcool etílico e, após, embebidas e infiltradas com parafina. Para a confecção das lâminas histológicas, as amostras foram seccionadas em uma direção látero-lateral, paralela ao longo eixo longitudinal da cavidade óssea remanescente, após a remoção dos implantes. Quatro secções foram feitas por cavidade óssea; porém, não foi possível analisá-las. Os mesmos procedimentos foram repetidos para as amostras IC14-2, IC42-2, IH14-2, IH42-2, IIC14-2, IIC42-2, IIH14-2 e IIH42-2, somente com uma secção, após o teste de tração (pull-out). Cada secção foi reduzida à espessura de aproximadamente 10 µm e, então, corada com hematoxilina-eosina (método HE).

As secções foram observadas em microscopia óptica de reflexão (Olympus BX60®, Olympus Co, Japão) em magnificação de 20 a 60 vezes, onde foi possível a descrição histológica qualitativa do tecido periimplantar. As análises foram todas realizadas pelo mesmo pesquisador (calibrado), o qual desconhecia a que grupo pertencia cada amostra (cegado) [57].

Tabela 4.2. Implantes divididos pelo tipo de caracterização realizada.

Grupos	Subdivisão dos Grupos	Implantes	Caracterização	
Grupos I Implantes PSA	IC14(PSA14d)	Implante IC14-1	Histomorfologia	
		Implante IC14-2	Pull-out, MO, MEV	
		Implante IC14-3	MO, FTIR, MEV	
	IC42(PSA42d)	Implante IC42-1	Histomorfologia	
		Implante IC42-2	Pull-out, MO, MEV	
		Implante IC42-3	MO, MEV	
	IH14 (PSA- H14d)	Implante IH14-1	Histomorfologia	
		Implante IH14-2	Pull-out, MO, MEV	
		Implante IH14-3	MO, FTIR, MEV	
	IH42(PSA- H42d)	Implante IH42-1	Histomorfologia	
		Implante IH42-2	Pull-out, MO, MEV	
		Implante IH42-3	MO, MEV	
	Grupo II Implantes PSA- Nano	IIC14 (PSA-nano14d)	Implante IIC14-1	Histomorfologia
			Implante IIC14-2	Pull-out, MO, MEV
			Implante IIC14-3	MO, FTIR, MEV
IIC42 (PSA-nano42d)		Implante IIC42-1	Histomorfologia	
		Implante IIC42-2	Pull-out, MO, MEV	
		Implante IIC42-3	MO, MEV	
IIH14(PSA-nano- H14d)		Implante IIH14-1	Histomorfologia	
		Implante IIH14-2	Pull-out, MO, MEV	
		Implante IIH14-3	MO, FTIR, MEV	
IIH42(PSA-nano- H42d)	Implante IIH42-1	Histomorfologia		
	Implante IIH42-2	Pull-out, MO, MEV		
	Implante IIH42-3	MO, MEV		

4.6.2. Preparação das amostras para o MO, MEV e FTIR

Quatro (4) implantes com cicatrização precoce (14 dias) – IC14-3, IH14-3, IIC14-3 e IIH14-3 – foram selecionados para análise por MO e FTIR. Ainda, outros 4 (quatro) implantes com cicatrização de 42 dias – IC42-3, IH42-3, IIC42-3, IIH42-3 – foram selecionados para as análises de MO, MEV e FTIR. Para caracterizar os corpos de prova, foi necessário prepará-los, colocando-os inicialmente em banho ultrassônico com água deionizada por 72 horas para remoção do formol, sendo que a água foi trocada a cada 24 horas. Após o banho ultrassônico, as amostras foram liofilizadas a vácuo em dez etapas com banhos intermediários com álcool etílico desde 10% vol. até álcool absoluto (100 %), resultando em uma amostra como a da figura 4.4.

Após a liofilização, as amostras foram embutidas em vácuo com resina de poliéster para serem preparados os corpos de prova. Os blocos foram cortados em secção longitudinal, próximo aos implantes, como mostrado na figura 4.5.



Figura 4.4. Tíbia do coelho após a liofilização.

As amostras foram lixadas, manualmente, com uma sequência de lixas de gramaturas desde 60 até 4000, fixadas em bloco de vidro e sob irrigação com água corrente e, posteriormente, foi realizado polimento em politriz metalográfica com pasta de diamante de 9 μ m e 1 μ m, com irrigação constante e com uma mistura de

álcool isopropílico/propilenoglicol (1:1), conforme a figura 4.6. O objetivo deste preparo foi a obtenção de uma superfície polida no local do implante e nas suas adjacências, mantendo a característica da matriz óssea inorgânica e do implante para observação microscópica; entretanto, esta técnica não preserva as células orgânicas.

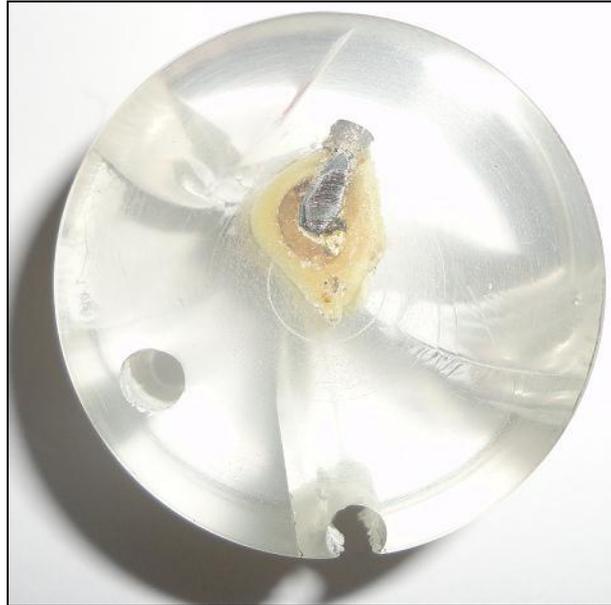


Figura 4.5. Corpo de prova antes do polimento.

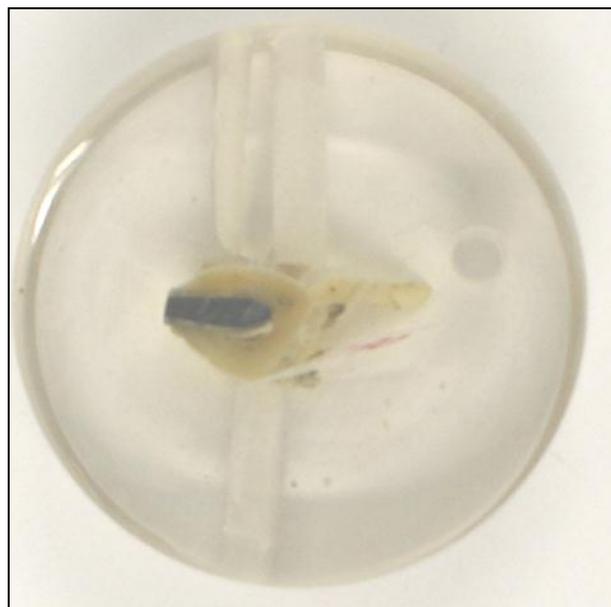


Figura 4.6. Corpo de prova polido e lixado, pronto para ser analisado no MO.

Após o preparo, os corpos de prova foram submetidos, em um primeiro momento, à microscopia óptica de reflexão, com o aparelho Olympus BX60® (Olympus Co, Japão) em magnificações de 50x, 100x e 200x. Nesta etapa, foram obtidas as imagens microscópicas que revelaram a microestrutura dos implantes e a qualidade do osso neoformado, mostrando os detalhes da osseointegração, na interface osso-implante.

A seguir, os mesmos corpos de prova foram submetidos à caracterização por espectro de infravermelho (FTIR), onde 100 varreduras foram realizadas para obter uma curva com pouco ruído e as análises foram feitas em um microscópio por ATR acoplado no equipamento Prestige 21® (Shimadzu, Japão) e convertidas no programa OriginPro 8® (OriginLab, EUA). A finalidade desta caracterização foi quantificar a presenças das fases fosfato e colágeno no osso novo (figura 4.7) [62,63].

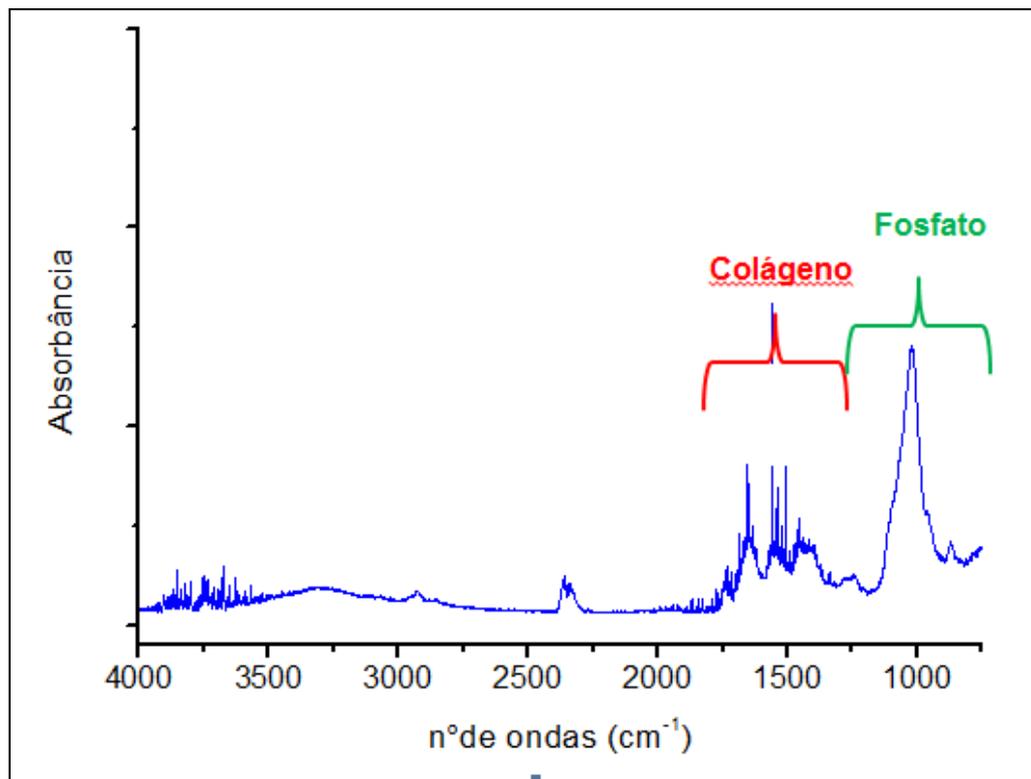


Figura 4.7. Picos de energia do FTIR.

Após analisar os comprimentos de onda correspondentes do carbonato, fosfato e colágeno (amidas I, II e III), foi feito um cálculo da área dos picos para verifi-

car a quantidade de fosfato e colágeno, apresentada em cada amostra (Figura 4.8). Em todos os gráficos foi utilizada a região aproximada 1800-1300 e de 1200- 900 cm^{-1} para identificar as concentrações de colágeno e fosfato, respectivamente.

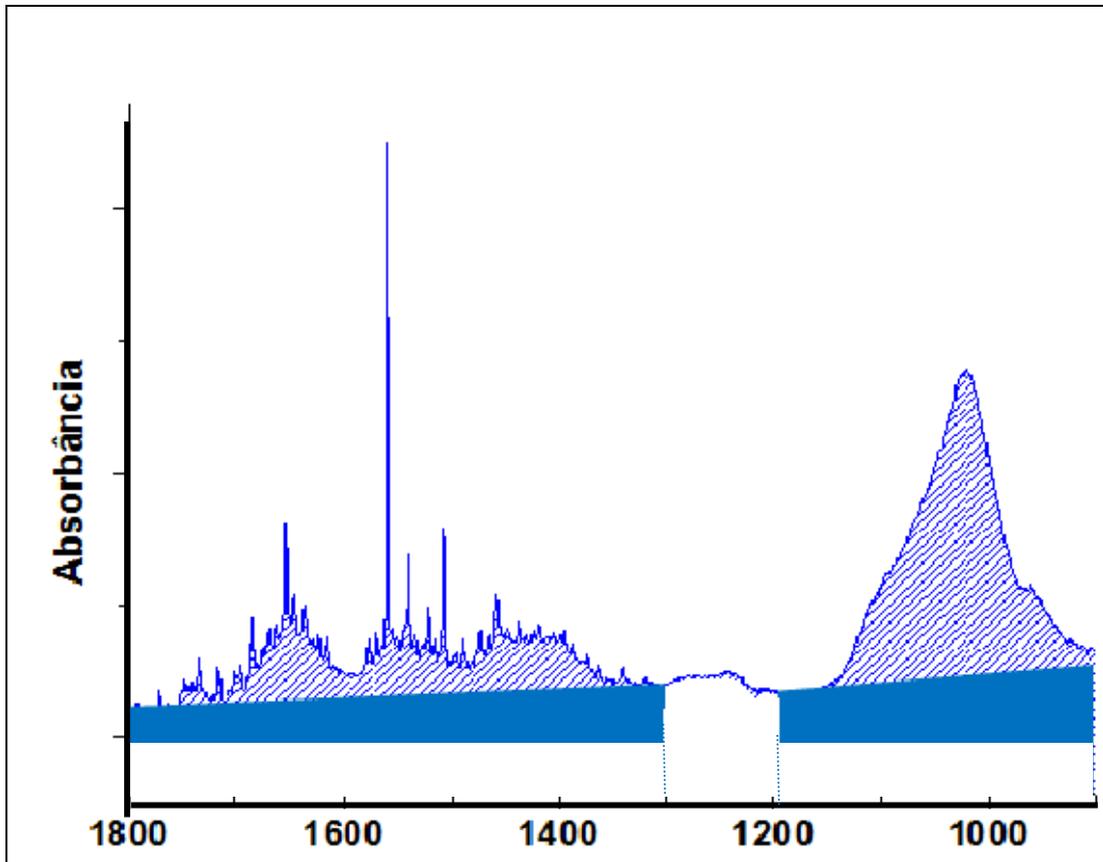


Figura 4.8. Gráfico absorvância x nº de ondas que permite o cálculo das áreas dos picos de cada um dos componentes químicos.

Num primeiro momento, foi calculada a área total do pico do fosfato, subtraída da área em azul, resultando então na área do fosfato. Em seguida, o mesmo cálculo foi realizado para o grupo do colágeno (amidas), resultando na área do colágeno.

Por último, os mesmos corpos de prova foram submetidos à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), da marca Philips, modelo XL 30, em magnificações de 50x, 100x, 200x e 500 vezes. O MEV permite analisar microestruturas e a neoformação óssea. Nesta etapa, foi possível visualizar as microestruturas dos implantes e estruturas adjacentes em escala micrométrica.

4.6.3. Preparação das Amostras para *Pull-Out*

Um total de 8 (oito) amostras – IC14-2, IC42-2, IH14-2, IH42-2, IIC14-2, IIC42-2, IIH14-2, IIH42-2 – também submetidas ao banho ultrassônico e liofilização (descritos anteriormente) foram selecionadas para o teste biomecânico de osseointegração (*pull-out*). As tíbias foram embebidas em resina de poliéster insaturada (Resapol 10249®, Reichold Co., EUA), mantendo a porção extraóssea dos implantes expostas (Figura 4.9).

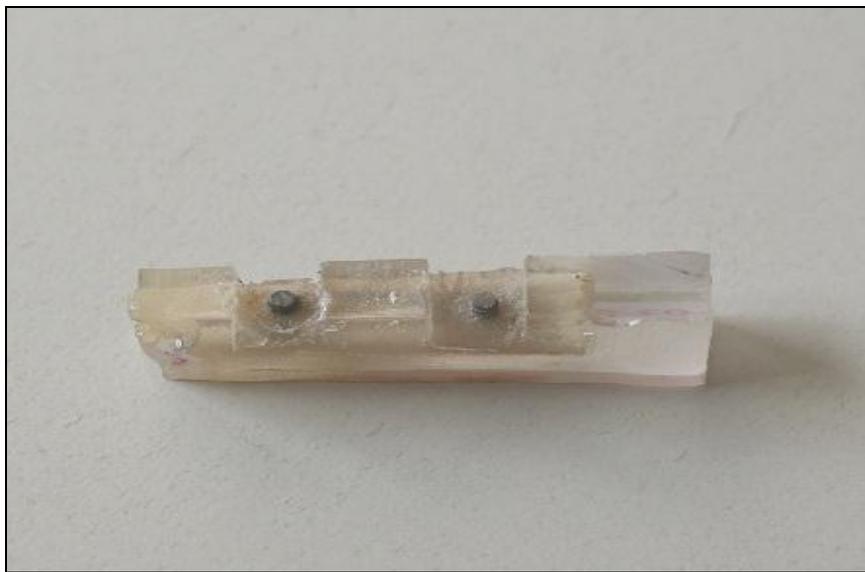


Fig. 4.9. Conjunto contendo a tíbia e os implantes embebidos em resina de poliéster insaturada, pronto para o teste *pull-out*.

Para a execução do teste, foi confeccionada, especialmente para este experimento, uma pinça que tinha a finalidade de agarrar o implante (Figura 4.10).

As tíbias emblocadas na resina foram então montadas na máquina de testes universal (EMIC DL-2000®, São José dos Pinhais, Brasil). Elas foram submetidas ao teste biomecânico de *pull-out*, realizado no laboratório de Tecnologia dos Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia da PUCRS. O ensaio consistiu na mensuração da força necessária à extrusão mecânica dos implantes da tíbia (figura 4.11).

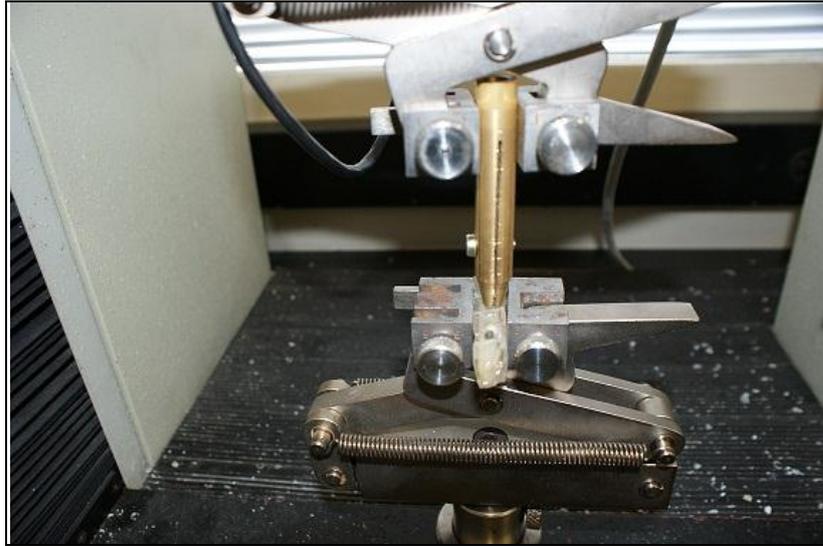


Figura 4.10. Pinça utilizada no teste biomecânico de pull-out.

As mensurações foram feitas, usando uma célula de força de 500N e uma taxa de deformação constante de 1 mm/min. A força foi aplicada até o completo desprendimento do implante da tíbia. Foi registrada a curva tensão-deformação e, a partir dela, foram calculados os valores de energia, mostrado na figura 4.11. Esses testes seguiram na metodologia citada na norma “ASTM C-633” para adesão de filmes em substratos.



Figura 4.11. Teste de tração (pull-out) sendo realizado na máquina de testes universal (EMIC DL-2000®) e o computador que mostra a curva de tensão-deformação.

Os implantes utilizados no teste do “pull-out” foram submetidos à análise superficial, por espectrometria de dispersão de energia (EDS) para avaliar a quantidade de cálcio e fósforo (composição da hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)) na superfície, após a sua remoção. A microanálise por EDS é semiquantitativa, servindo como um indicador das quantidades de cada elemento presente, porém não pode ser tomada como análise quantitativa.

Para a obtenção de uma estatística da composição média em toda a superfície do implante, foi utilizado um retângulo de 4,07 mm x 1,58 mm na imagem do implante, na tela do computador, obtida com o MEV, onde foi possível calcular a quantidade total de íons cálcio e fósforo existentes em relação ao titânio (Figura 4.12). Como parte do processo de preparação das amostras, as peças foram metalizadas, isto é, cobertas com uma fina camada de ouro. Nesta etapa, foi encontrada a quantidade aproximada dos elementos que compõem o osso.

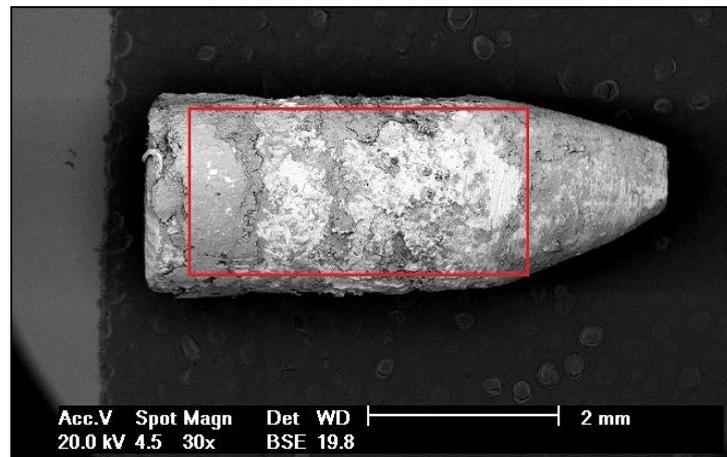


Figura 4.12. Retângulo da imagem do implante no MEV para análise por EDS.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este estudo teve por objetivo estudar a influência do uso de superfícies nano-texturizadas, e verificar o papel do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) no processo de osseointegração de implantes de titânio. Vinte e quatro protótipos de implantes foram colocados na tíbia de coelhos e, alocadas em 8 grupos, de acordo com o tipo de tratamento de superfície (Grupo I = implantes PSA; Grupo II = implantes PSA-nano). A associação ou não com o hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) (C = controle; H = presença do hormônio) e os diferentes períodos observacionais (14 ou 42 dias), após a obtenção dos corpos de prova foram submetidos à análise por MO, MEV, FTIR, *Pull-Out* e EDS. Diversos testes e uma técnica meticulosa de preparação das amostras foram empregados para a avaliação dos diferentes tipos de superfície, associados ou não ao hormônio do crescimento e em diferentes tempos de acompanhamento no processo de neoformação óssea ao redor dos implantes. Os resultados serão apresentados em três etapas - análise do tipo de superfície, utilização ou não do hormônio e o tempo de cicatrização.

5.1. Avaliação qualitativa da Histologia por Microscópio Óptico

A figura 5.1-a mostra a análise histológica por microscopia óptica no estágio inicial de osseointegração da amostra IC14. Esta amostra apresenta a existência de uma pequena região de osso neoformado (formação de células desorganizadas e de tamanhos variados), mostrando regiões de canais de reabsorção ao redor do implante inferior à amostra nanotexturizada (IIC14). Como mostrado na figura 5.1-b, esta amostra apresenta uma neoformação óssea periimplantar superior, apresentando uma maior região de osso novo próximo ao implante, o que permite concluir que a superfície nanotexturizada favorece a neoformação óssea nas fases iniciais.

No estágio tardio da cicatrização, foi possível verificar que a amostra IC42 (figura 5.1-c) exibiu uma região periimplantar com tecido ósseo imaturo e com moderado contato osso-implante. Por outro lado, a amostra IIC42 exibe um intenso contato osso-implante, com crescimento ósseo nas cavidades do implante, como mostrado na figura 5.1-d. Estes resultados corroboram os de Cunha (2007) [63] que mostraram, usando modelo animal em ovelha, que superfícies PSA-nano apresentam elevada atividade osteoblástica levando a uma formação de osso novo denso e organizado, mesmo em estágios iniciais, se comparados a outros tipos de superfície.

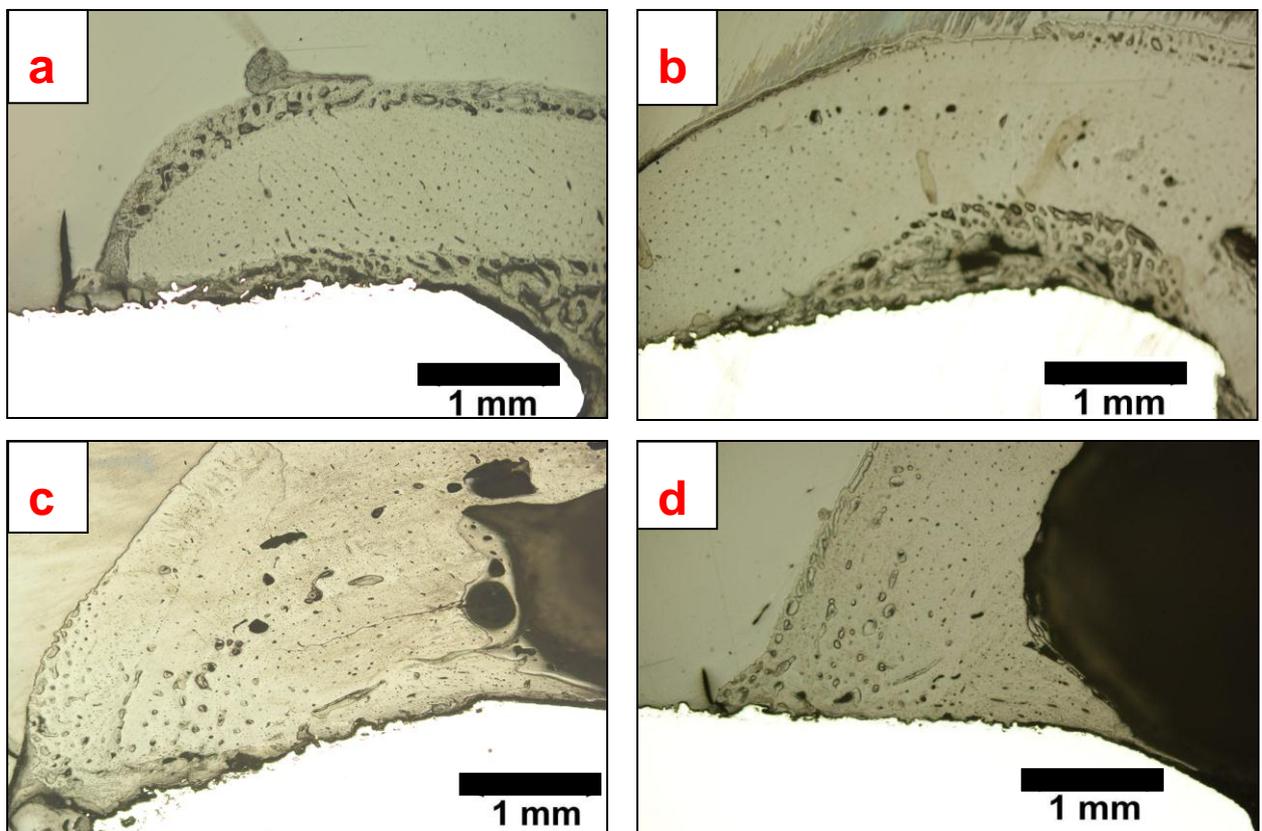


Figura 5.1. Micrografia com magnificação de 50x na interface osso-implante das amostras do grupo controle (a) IC14; (b) IIC14; (c) IC42 e (d) IIC42.

Nas amostras, onde o hormônio do crescimento - IH14 e IIH14 - foi utilizado, respectivamente, (figuras 5.2-b e 5.2-d) percebeu-se a presença de uma grande região de osso novo ao redor do implante, permitindo claramente concluir que o uso do hormônio favoreceu a neoformação óssea no estágio inicial. Além disso, comparando com as amostras do Grupo I (figura 5.2-b), verificou-se que a amostra IIH14 (figura 5.2-d) apresenta uma maior quantidade de osso neoformado, mostrando que

o hormônio acelera o processo de osseointegração, quando comparado ao implante do Grupo I sem o hormônio (figura 5.2-a).

Na amostra IIH42, foi possível verificar a presença de regiões com tecido ósseo imaturo, onde possíveis regiões de transição do osso novo para o maduro estavam presentes, e com moderado contato osso-implante apresentando também algumas cavidades próximas ao implante. Já na amostra IH42 (figura 5.2-f), a utilização do hormônio do crescimento foi favorável, apresentando regiões de osso maduro próximo ao implante, enquanto que a amostra IC42 (figura 5.1-e) apresentou formação de osso novo, não tendo osso maduro ao redor do implante. Independentemente da presença ou não do hormônio do crescimento nas amostras do Grupo II, foi possível perceber que elas apresentaram uma maior neoformação óssea em 14 dias, quando comparadas às amostras do Grupo I, o que por sua vez sugere um possível aumento da estabilidade inicial dos implantes de titânio.

Comparando as amostras em função do tempo de reparo, é possível verificar que a amostra IIC14 apresentou formação de osso novo, enquanto que a amostra IIC42 apresentou a formação de osso maduro. Na figura 5.2-a, foi possível observar a presença de uma pequena região de osso neoformado, enquanto que na figura 5.1-e nota-se o tecido ósseo imaturo na região periimplantar.

Comparando as amostras em função do tempo de reparo e do uso do hormônio do crescimento, é possível afirmar que a amostra nanotexturizada IIH14 (figura 5.2-d) apresentou uma neoformação óssea significativa, enquanto que na figura 5.2-h, observa-se que a amostra IIH42 mostrou a presença de osso maduro ao redor do implante. Na figura 5.2-b (amostra IH14), foi possível verificar a ocorrência de neoformação óssea, enquanto que na amostra IH42 (figura 5.2-f) verifica-se os bons resultados na formação do osso maduro que apresentando os canais de Havers e com o contato osso-implante moderado.

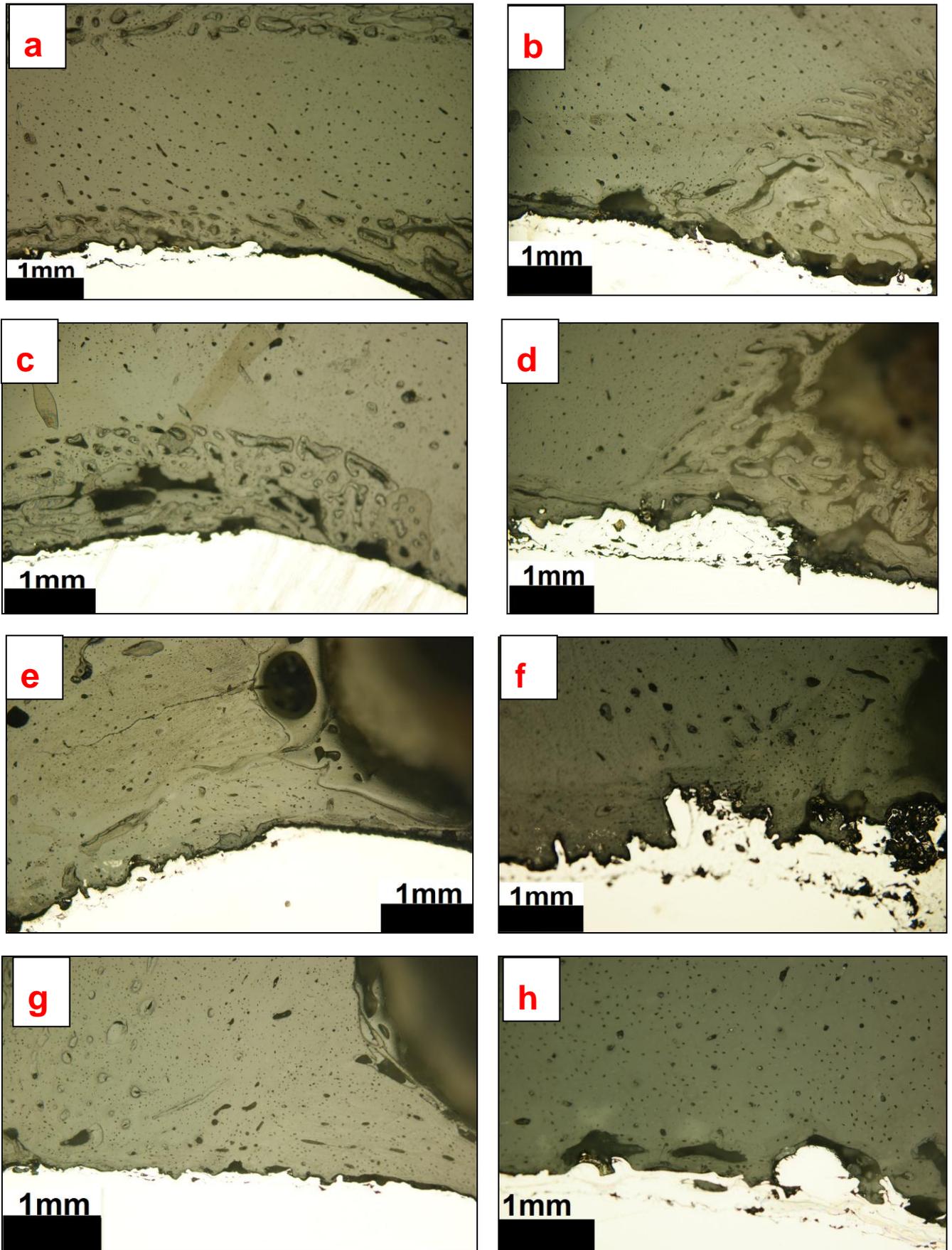


Figura 5.2. Micrografia com magnificação de 100x na interface osso-implante das amostras IC14 (a); IH14 (b); IIC14 (c); IIH14 (d); IC42 (e); IH42 (f); IIC42 (g); IIH42 (h).

5.2. Avaliação qualitativa das Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras de 14 dias não estiveram disponíveis para a análise por MEV porque a preparação das amostras para esse teste inclui a metalização da superfície com ouro, o que as inviabiliza para a análise por FTIR. Assim, estas amostras foram selecionadas para a análise por FTIR exclusivamente, portanto foram eliminadas da análise por MEV.

Desta forma, as amostras de 42 dias foram analisadas no MEV, mostrando resultados semelhantes aos do microscópio óptico (MO). Foi possível verificar que na amostra IC42 (figura 5.3-a), a região periimplantar apresentou tecido ósseo imaturo e com moderado contato osso-implante. Já a amostra IIC42 (figura 5.3-b) mostrou íntimo contato osso-implante, com crescimento ósseo nas cavidades do implante.

Na amostra IH42, figura 5.3-c, a utilização do hormônio do crescimento exibiu regiões de osso maduro próximo ao implante. Na amostra IIH42, figura 5.3-d, em que o hormônio do crescimento foi utilizado, verificou-se regiões com tecido ósseo imaturo e com moderado contato osso-implante, mostrando também algumas cavidades próximas ao implante.

Nas amostras de 42 dias com superfícies nanotexturizadas percebeu-se que a amostra IIC42 (figura 5.3-b) possuía características de tecido ósseo maduro, enquanto que a amostra IIH42 (figura 5.3-d) ainda estava em fase de remodelamento. Nas amostras PSA foi observado que o hormônio do crescimento mostrou-se favorável, apresentando regiões de osso maduro próximo ao implante (IH42, figura 5.3-c). Já o implante PSA, sem o uso do hormônio (IC42, figura 5.3-a), apresentou formação de osso novo não tendo osso maduro ao redor do implante.

Verificou-se que a liberação do hormônio foi favorável para a amostra IH42 (figura 5.3-b), mostrando bons resultados quando do uso desse hormônio com uma superfície plasma-spray. Já com a superfície nanotexturizada, a melhor resposta de

osseointegração está na amostra de 42 dias, sem o uso do hormônio. Isso se deve, possivelmente, ao fato de que, quando usamos a superfície nanotexturizada, ela retém mais hormônio na fase inicial, devido à sua nanoporosidade, justificando os ótimos resultados no estágio inicial. Contudo, com o crescimento rápido e desordenado na fase inicial, estas amostras estão sujeitas ao remodelamento mais severo, levando a grandes regiões reabsorvidas e com a formação de lacunas.

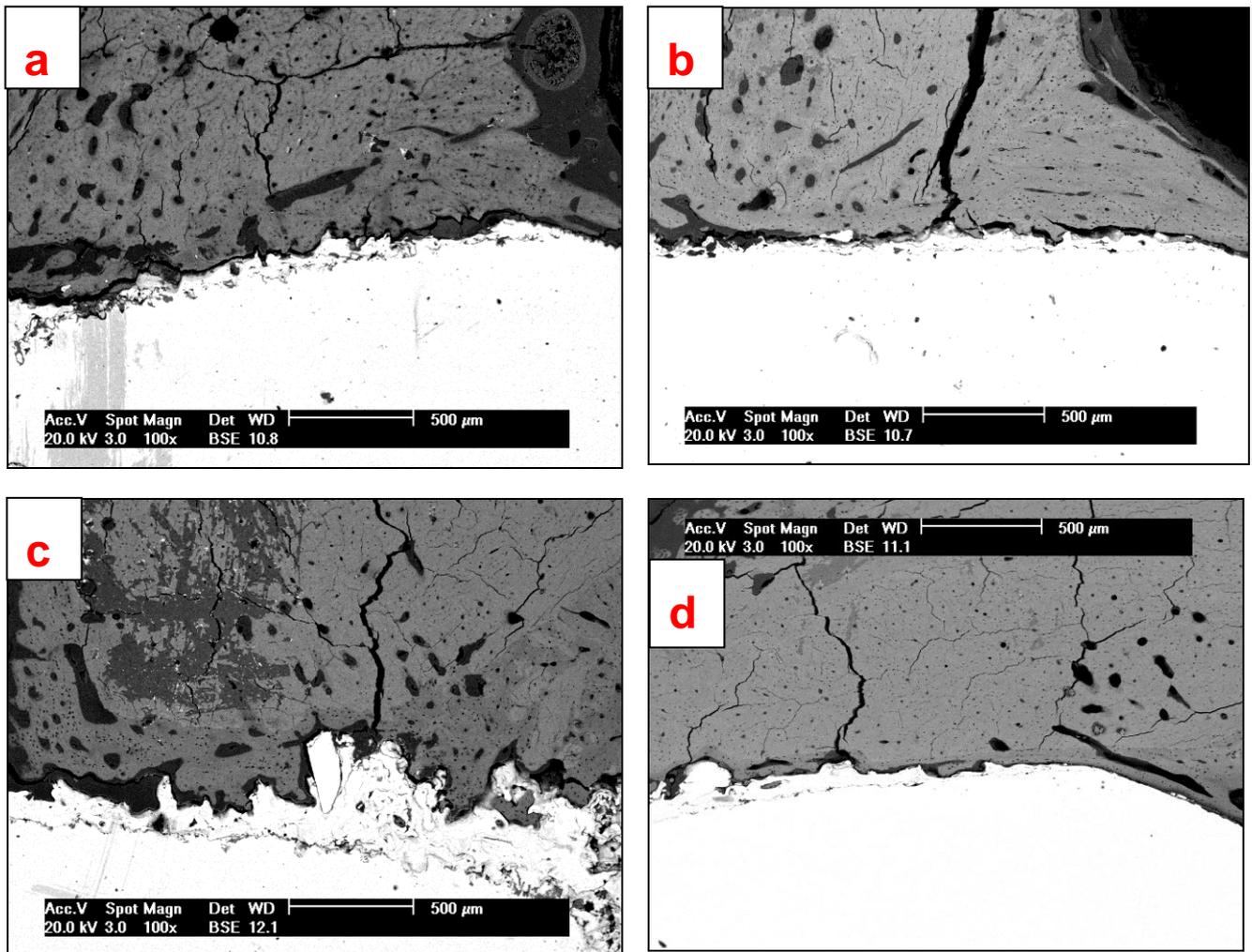


Figura 5.3. Microscopia eletrônica com magnificação de 100x da interface osso implante das amostras do grupo controle (a) IC42; (b) IIC42; (c) IH42 e (d) IIH42.

Comparando as duas análises é possível perceber que tanto o MEV quanto o MO complementaram resultados de osseointegração. Deixando claro que com as duas técnicas é possível analisar neoformação óssea.

Comparando os resultados de HE do trabalho de Abreu (2011) [57], verificou-se que os melhores resultados encontrados foram nas amostras de 42 dias, mostrando que a superfície nanotexturizada teve um maior crescimento ósseo e que a que melhor respondeu à liberação do hormônio foi a plasma-spray.

5.3. Análise do espectro de Infra-vermelho (FTIR)

Como pôde ser observado na tabela 5.1, na análise de FTIR os melhores resultados encontrados na quantidade de fosfato e colágeno está nas amostras com o tempo de cicatrização de 42 dias, mostrando neste caso a formação de um osso maduro [64].

Analisando os gráficos de FTIR do tempo de cicatrização de 42 dia, encontra-se o melhor resultado na amostra controle com superfície nanotexturizada porque apresenta uma maior quantidade de fosfato e de colágeno comparado à amostra controle *plasma spray*. Já nos espectros de FTIR das amostras com o uso do hormônio, o melhor resultado encontrado está na amostra com superfície *plasma spray* porque apresenta uma maior quantidade de fosfato e de colágeno comparável com a amostra nanotexturizada com hormônio do crescimento.

Tabela 5.1. Valores da área de fosfato e colágeno pela técnica do FTIR.

	IC14-3	IIC14-3	IH14-3	IIH14-3	IC42-3	IH42-3	IIC42-3	IIH42-3
Área do Colágeno	29,276	9,672	2,747	7,393	6,072	11,195	14,541	8,292
Área do Fosfato	11,978	16,148	6,016	12,290	25,069	36,542	39,226	22,636
Σ da área	41,3	25,9	8,7	19,6	31,1	47,8	53,8	30,9

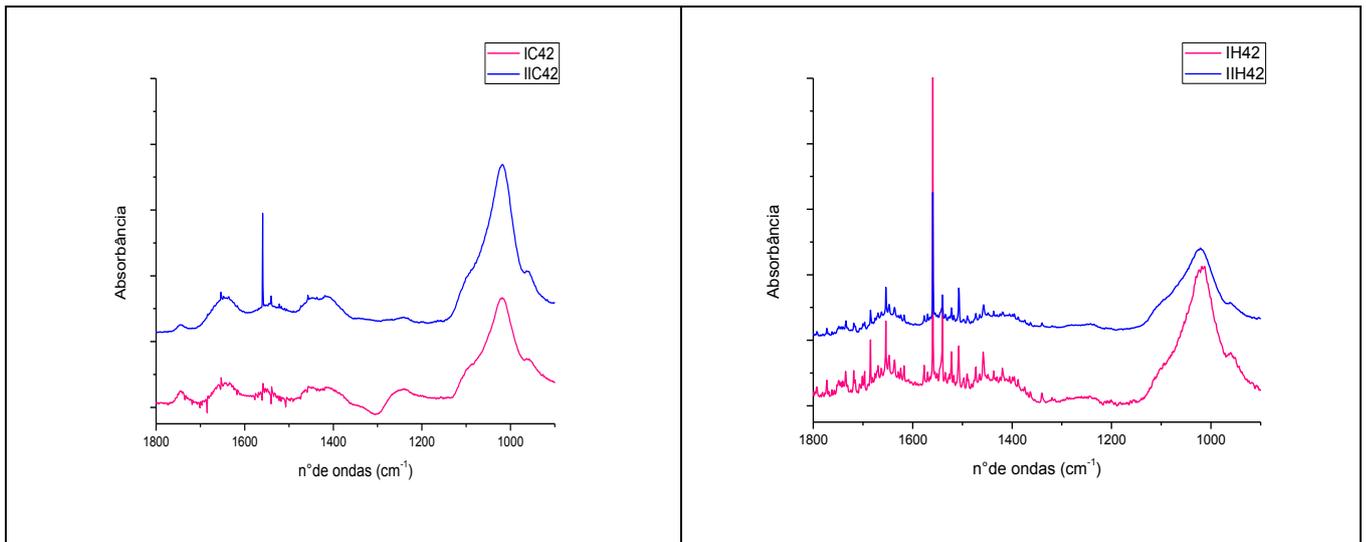


Figura 5.4. Espectro de FTIR das amostras com tempo de cicatrização de 42 dias.

5.4. Análise Biomecânica de Tração (*pull-out*) e Espectro de Energia Dispersiva (EDS)

Por ser uma adaptação nova para medir a osseointegração, em algumas amostras, a pinça deslizou e despreendeu-se do equipamento, inviabilizando o teste. Para as demais amostras, os valores encontrados no teste de tração *pull-out* estão descritos na tabela 5.2. Assim, somente foi possível analisar as diferentes superfícies em 42 dias, além do uso do hormônio do crescimento para a superfície nanotexturizada em 42 dias e do tempo de cicatrização para a superfície nanotexturizada sem o hormônio.

Tabela 5.2. Valores de resistência à tração pelo teste *pull-out*.

	IC42-2	IH14-2	IIC14-2	IIC42-2	IIH42-2
Tensão (MPa)	25,99	59,26	33,88	78,95	29,69

Analisando as amostras no tempo inicial de cicatrização IH14 e IIC14 é possível verificar que a amostra com o uso do hormônio do crescimento obteve um melhor resultado comparado com a de 14 dias sem uso do hormônio. Este achado confirma o resultado obtido com a micrografia, em que o uso do hormônio no tempo inicial de cicatrização resulta em uma maior formação de osso do que as amostras sem a presença do hormônio.

Comparando os dois implantes de 42 dias - IIC42 e IC42 – percebe-se que a amostra com estrutura nanotexturizada apresentou uma maior resistência à tração. Analisando o tempo de cicatrização de duas amostras controle nanotexturizadas é possível verificar que amostra de IIC42 teve uma maior resistência à tração do que a amostra de 14 dias.

Nas amostras nanotexturizadas de 42 dias com e sem hormônio, observou-se que a amostra que apresentou a maior resistência à tração foi aquela de 42 dias sem o hormônio do crescimento (IIC42). Isso confirma que os resultados obtidos com os outros métodos de análise, em que as amostras de 42 dias nanotexturizadas apresentaram a melhor resposta na estrutura da formação do osso.

Os implantes removidos das amostras do teste de tração *pull-out* foram analisados por espectrometria de dispersão de energia (EDS), para avaliar a quantidade de cálcio e de fósforo na superfície, juntamente com o titânio (Ti) e o ouro usado para metalizar o tecido ósseo. Com esta análise podemos avaliar, além da razão Cálcio/Fósforo (Ca/P), a espessura da camada de osso retida na superfície, através da intensidade do titânio. Assim, quanto menor for o sinal do titânio, maior será a espessura do osso aderido à superfície. Detalhes desta medida são apresentados na tabela 5.3 e na figura 5.5.

Tabela 5.3. Quantidade de cálcio e fósforo na superfície analisadas pelo EDS.

Átomos/%	IC14-2	IC42-2	IH14-2	IH42-2	IIC14-2	IIC42-2	IIH14-2	IIH42-2
Fósforo	5,98	4,47	7,84	5,05	7,98	12,58	5,14	7,77
Cálcio	5,93	3,58	7,02	1,58	8,55	16,29	3,56	12,69
Titânio	54,7	71,06	38,46	51,94	55,43	25,2	65,03	52,06
Ouro	33,39	20,89	46,69	41,42	28,05	45,94	26,27	27,55

Na figura 5.5 é possível verificar que todas as amostras tiveram resultados semelhantes na quantidade de fósforo e de cálcio, mostrando a presença de grande quantidade de osso nas superfícies removidas. É possível perceber por esta análise que a amostra que apresentou formação de osso favorável foi a amostra nanotexturizada, controle de 42 dias (IIC42). Também apresenta resultados que mostram a qualidade do osso aderido nas superfícies, indicando que quanto menor é a quanti-

dade de titânio, maior é a quantidade de osso; portanto, melhor é a osseointegração.

A partir destes resultados, foi elaborado um cálculo de razão de cálcio/fósforo (Ca/P), conforme apresentado na tabela 5.4. O trabalho de Filho e cols. [65] sugere uma razão ideal de íons cálcio/fósforo (razão Ca/P) como sendo de 1.67, que é a razão estequiométrica da hidroxiapatita ((Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂).

Tabela 5.4. Mostra a razão de cálcio/fósforo.

Atomo/ %	IC14	IC42	IH14	IH42	IIC14	IIC42	IIH14	IIH42
Fosforo	63,13	65,06	66,55	85,71	57,56	55,89	68,66	47,84
Cálcio	36,87	34,94	33,45	14,29	42,44	44,11	31,34	52,16
razao	0,58	0,54	0,50	0,17	0,74	0,79	0,46	1,09

A análise desta tabela permite concluir que as amostras que se situam próximo a esta razão são as amostras IIC42 e IIH42. Mostrando também que as amostras que obtiveram maior quantidade de Cálcio são as amostras nanotexturizada.

Mesmo sabendo que as proporções de cálcio e de fósforo variam, significativamente, durante a remodelação do osso, os resultados apontam para fatores que definem a maturidade do osso neoformado, indicando que a amostras com maior tempo de cicatrização e com superfície nanotexturizada são as melhores. Por outro lado, a amostra IH42, que apresentou um dos melhores resultados de osseointegração, aparece com a pior relação neste teste. Estas contradições devem ser bem mais estudadas para verificar se há ou não alguma relação entre estes resultados e a maturidade do osso neoformado.

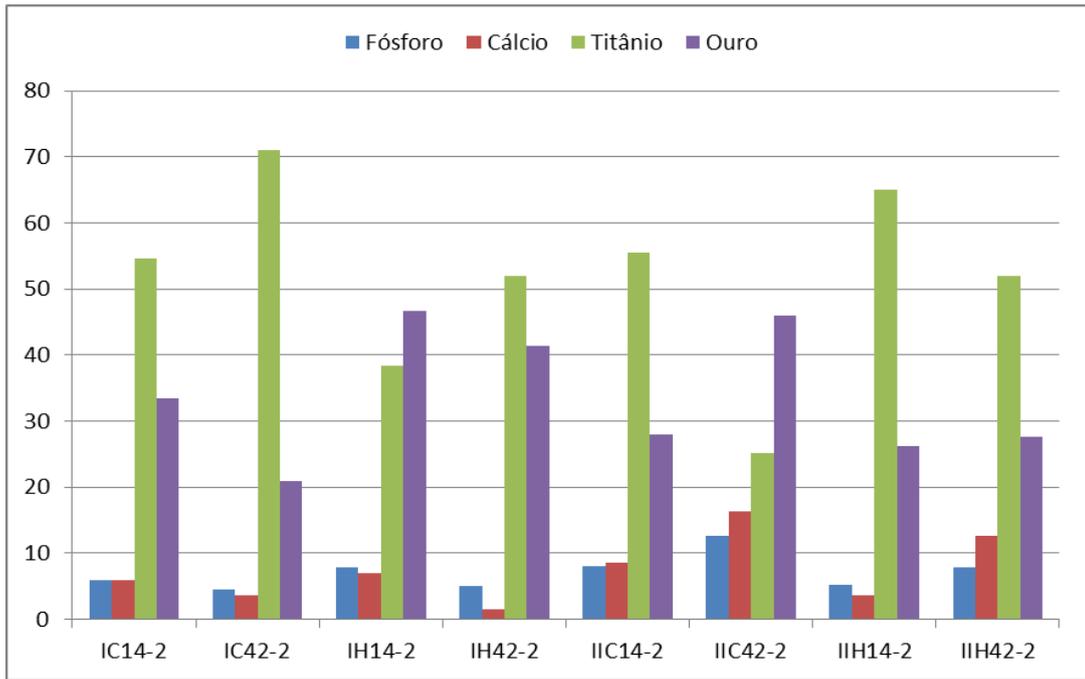


Figura 5.5. Análise quantitativa de fósforo e cálcio.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho, independentemente do tempo de cicatrização, do tipo de superfície ou do uso de hormônio do crescimento, foram bem sucedidos clinicamente quanto à osseointegração. Em todos os casos, foi observada uma forte osseointegração com fartas regiões de osso neoformado, exibindo presença de canais de Havers e de Volkman e tecidos com organização celular. As técnicas propostas para avaliar a qualidade do osso neoformado se mostraram eficientes, principalmente a análise histológica por microscópio óptico (MO), mantendo o implante na parte mineral do osso. Ao contrário dos testes convencionais de HE, e picosirius red, onde o implante é removido e a estrutura mineral dissolvida, podemos ver a real interface osso-implante e “observar” a osseointegração de fato. Esta análise mostrou ser ideal para avaliar as regiões de osso novo, linhas incrementais e formação das estruturas lamelares no osso. As demais técnicas, apesar de concordarem com as análises do MO, apresentaram resultados subjetivos e ainda precisam de mais tempo e estatística de medidas para se tornarem conclusivas.

Neste trabalho foi possível concluir que, comparando as superfícies com e sem nanotexturização, estas obtiveram uma melhor resposta frente à neorformação óssea e à formação de osso maduro para as amostras de 42 dias, sem o uso do hormônio.

Nas amostras onde foi empregado o hormônio do crescimento, foi possível perceber uma maior resposta na neoformação óssea, no período de 14 dias. Esse fato mostra que o hormônio do crescimento aumenta a formação de osso novo nas etapas iniciais, (auxiliando nas fixações primárias), ocorrendo, no entanto, a formação de grande quantidade de tecido desorganizado. Este fato poderia justificar os resultados moderados aos 42 dias, uma vez que este tecido foi posteriormente reabsorvido pelos osteoclastos gerando as lacunas vistas nas imagens de 42 dias.

Levando em consideração o tempo de cicatrização foi possível perceber que o melhor resultado com uso do hormônio do crescimento foi no implante de superfície *plasma-spray* aos 42 dias. Neste caso, o hormônio representa um ganho. Contudo, quando usamos a superfície nanotexturizada, a qual retém mais hormônio na fase inicial devido a nanoporosidade, os resultados do período mais longo ficaram prejudicados. A maior atividade na etapa inicial pode comprometer os resultados de longo prazo, gerando perda de qualidade óssea como ocorre com o uso dos bisfosfonados. Contudo, como foram avaliados apenas dois tempos de cicatrização e uma concentração de rhGH, um estudo mais detalhado se faz necessário para definir a questão.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho mostrou, *in vivo*, resultados favoráveis da nanotexturização de superfície de implantes de titânio, associado ou não ao hormônio do crescimento recombinante humano (rhGH), em diferentes estágios do processo de osseointegração. No entanto, os resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que se baseiam em evidências de animais de laboratório. Os implantes utilizados são apenas protótipos dos implantes dentários empregados em pacientes e a sua macroestrutura não apresentava roscas, responsáveis pela macro-retenção do implante no interior do osso. Além disso, a amostra deste estudo foi pequena e os implantes não foram submetidos a carregamento funcional (colocação de prótese). Estudos clínicos prospectivos controlados, com pacientes recebendo próteses dentárias em diferentes tempos de osseointegração e com implantes de dimensões reais, submetidos aos mesmos tratamentos de superfície devem ser conduzidos para que conclusões definitivas possam ser tiradas e novas diretrizes clínicas possam ser adotadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] WORTHINGTON,P.; Lang, B. R; William E. **Osseointegração na Odontologia Uma introdução**. Editora Quintessence 1996.
- [2] THOMÉ, G., et al. **REVISTA IMPLANTNEWS**;4(3):237 237, 2007.
- [3]BRANEMARK, P. I. et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw.Experience from a 10-year period. **Scand J Plast Reconst Surg**; II, 1977.
- [4] LAN, J. et al. The effect of combination of recombinant human bone morphometric protein-2 and basic fibroblast growth factor or insulin – like growth factor – I on dental implant osseointegration by confocal laser scanning microscopy. **J Periodontol**. 77 (3): 357-63. 2006.
- [5] LE GHÉHENNEC, L. et al. Surface Treatment of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dental Materials**. 23: 844-54. 2007.
- [6] KARLSSON, U. et al. A 2-year report on maxillary and mandibular fixed partial dentures supported by Astra tech dental implants. A comparison of two implants with different surfaces. **Clin Oral Implants Res** 9: 91-9, 1998.
- [7] GIAVARESI,G. et al. Mechanical and histomorphometric evaluations of titanium implants with different surface treatments inserted in sheep cortical bone. **Biomaterials**. 24(9):1583-94,2003.
- [8] CORRENA , C. et al. Avaliação do efeito osteoindutor da hidroxiapatita e do biovidro implantados em tecido subcutâneo de cão **Revista Ceres**, 2007
- [9] CALVO, G. et al. Effects of growth hormone on initial bone formation around dental implants: a dog study, **Clin. Oral Impl. Res.** 10.1111, 2011.
- [10] CARVALHO, P.S. et al. Principais aspectos da cirurgia bucomaxilofacial no paciente sob terapia com bifosfonatos , **RFO UPF** vol.15 no.2 2010.
- [11]RASCHKE,S.M. et al. Homologous Growth Hormone Accelerates Healing of Segmental Bone Defects **Bone** Vol. 29, No. 4:368–373, 2001.
- [12] ROSS,M.H, Romrell, L.J. **Histologia**, Texto e Atlas. São Paulo: Panamericana, 1993, p.141-79.

- [13] LERNER U. H. Osteoclast formation and resorption. **Matrix Biology**. 2000; 19:107-20.
- [14] SCHENK R.K. **Regeneração óssea bases biológicas**. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK RK. Regeneração óssea Guiada na Implantodontia. São Paulo: Quintessence Books, 1996.
- [15] RENZ, Renata, **Avaliação da Osseointegração de Implantes de Titânio Submetidos a Diferentes Tratamentos de Superfícies**. Porto alegre.2007. p.111. Dissertação de mestrado Biomateriais. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, Brasil.
- [16] CARVALHO, M. Debora. Tecido Ósseo. Disponível em <http://www.infoescola.com/histologia/tecido-osseo>. Acesso em 28 de setembro de 2010.
- [17] LERNER UH. Cystatin C. An inhibitor of bone resorption produced by osteoblasts. **Acta Physiol. Scand**. 1997; 161:81-92.
- [18] TRISTRAM, G. et al. **Imunologia Médica**, Ed. Guanabara Koogan, 2004.
- [19] DURVAL, Damiani. Sistema Nervoso. (Professor assistente do setor de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo HCFMUSP) Disponível em <<http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=11>>. Acesso em 30 de setembro de 2010.
- [20] ROBBINS, C. **Pathologic Basis of Disease** - Kumar, Abbas and Fausto (eds) 7th Edition - International Edition
- [21] JUNQUEIRA L.C, CARNEIRO J, **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 111-128, 2004.
- [22] GERARD J. **Tortora** Sandra REYNOLDS Grabowski; **Corpo humano Fundamentos de Anatomia e Fisiologia**; Artimed , 2006.
- [23] Histologia.(Desenvolvido por Grupo Virtuoso) Disponível em <http://www.sobiologia.com.br/figuras/Histologia/remodelacao_ossea.jpg>. Acesso em 26 de outubro de 2010
- [24] ERIKSEN, E. F.; Kassem, M.; Langdahl, B. Growth hormone, insulin-like growth factors and bone remodeling. **Eur J Clin Investig.**; 26: 252-64, 1996.
- [25] SPIEKERMANN, H. **IMPLANTOLOGIA**, Porto Alegre, Artmed, 388p 2000.
- [26] WALL, I.; et al. Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro. **Bone**, 2009.
- [27] BYON, E.; et al. Electrochemical property and apatite formation of metal ion implanted titanium for medical implants. **Surface and Coatings Technology**, v.200, n.14, p.1018-1021, 2005.

- [28] LI, D.; et al. Effects of a modified sandblasting surface treatment on topographic and chemical properties of titanium surface. **Implant Dentistry**, v.10, n.1, p.59-64, 2001.
- [29] TEIXEIRA, E.R. Superfícies dos implantes – o estágio atual. In: DINATO, J. C. **Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese**. São Paulo: Artes Médicas, 2004. p.63-80.
- [30] SHAPIRA, L; Behavior of two osteoblast-like cell lines cultured on machined or rough titanium surfaces **Clin. Oral Impl. Res.** 20 / 50–55, 2009.
- [31] SCHLIEPHAKE, et al. Effect of modifications of dual acid-etched implant surfaces, **Journal compilation**, 2009.
- [32] PARK, J.W.; et al. Enhanced osteoconductivity of micro-structured titanium implants(XiVE S CELLplust) by addition of surface calcium chemistry: a histomorphometric study in the rabbit femur. **Clin. Oral Impl. Res.** 20, 2009
- [33] MENDONÇA G.; et al. Efeito de superfícies de implantes nano-estruturadas na expressão de genes de osteoblastos e no contato osso-implante in vivo. **Rev Odontol Bras Central** 2010;19(50):196-204.
- [34] NISHIMURA, I.; et al. Discrete deposition of hydroxyapatite nanoparticles on a titanium implant with predisposing substrate microtopography accelerated osseointegration. **Nanotechnology** 2007;18:1-9.
- [35] MENDES, V.C, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. **Biomaterials** 2007;28(32):4748-55.
- [36] MEIRELLES, L.; et al. The effect of chemical and nanotopographical modifications on the early stages of osseointegration. **Int J Oral Maxillofac Implants**, 2008;23(4):641-647.
- [37] MEIRELLES, L.; et al. Effect of hydroxyapatite and titania nanostructures on early in vivo bone response. **Clin Impl Dent Relat Res**, 2008;10(4):245-54.
- [38] GOÉNE, R.J, Testori T, Trisi P. Influence of a nano-meter scale surface enhancement on de novo bone formation on titanium implants: a hystomorphometric study in human maxillae. **Int J Period Rest Dent** 2007;27(3):211-19.
- [39] CURTIS, A, Wilkinson C. New depths in cell behaviour: Reactions of cells to nanotopography. **Biochem Soc Symp** 1999;65:15-26.
- [40] LYNCH, S. E.; et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. **J Periodontol**. 1991 Nov; 62 (11): 710-6.
- [41] CALVO-GUIRADO, J.L.; et al. Effects of growth hormone on initial bone formation around dental implants: a dog study, **Clinical. Oral Implants . Research**. 22, 2011 / 587–593

- [42] RASCHKE, M.; et al. Homologous growth hormone accelerates healing on segmental bone defects. **Bone** 2001; 29 (4): 368-73.
- [43] BAIL, H. J.; et al. Recombinant species-specific growth hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis. **Bone** 2002; 30 (1): 117-24.
- [44] GRAHAM, M R.; et al. Recombinant Human Growth Hormone in Abstinent Androgenic-Anabolic Steroid Use: Psychological, Endocrine and Trophic Factor Effects; Current Neurovascular **Research**, 2007, Vol. 4, No.1
- [45] GUYTON, A. C. **Textbook of medical physiology**. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.
- [46] KOLBECK, S. et al. Homologous growth hormone accelerates bone healing – a biomechanical and histological study. **Bone** ; 33: 628-37,2003.
- [47] CAMPOS, D.M. **Produção e Caracterização de Colágeno tipo I e de Compósitos hidroxiapatita-Colágeno para Regeneração Óssea** . Rio de Janeiro .2008. 112 p. Dissertação de Mestrado em Ciências da Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.
- [48] ORÉFICE, R.L., Pereira, M.M., Mansur, H.S., **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**, 1 ed. Rio de Janeiro, Cultura Médica 2006.
- [49] BOSKEYA, A.L., Mendelsohn, R. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues, **PMC**, 2006.
- [50] BOSKEY, A. L., Mendelsohn, R., Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues, **Vib. Spectrosc.**, 38, 107, 2005.
- [51] PASCHALI, E. P, Fourier transform infrared analysis and bone. **Osteoporos Int** 20:1043–1047,2009.
- [52] Renz, R.P.; Cunha, A. Wantowsky, G.; Blando, E.; Hübler, R. “Osseointegration evaluation of treated surfaces of titanium implants applying tensile pull out test“. **Rev. Clín. Pesq. Odont** v. 3, p. 149-157, 2007.
- [53] RONOLD, H.J., Ellingsen JE. Effect of microroughness produced by TiO₂ blasting on tensile testing of bone attachment by using coin-shaped implants. **Biomaterials**. 2002; 23:4211-4219.
- [54] RONOLD HJ, Ellingsen JE. The use of a coin shaped implant for direct in situ measurement of attachment strength for osseointegrating biomaterial surfaces. **Biomaterials**. 2001;23:2201-2209.
- [55] JUNQUEIRA LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**; 11, 447-455. 1979

[56] ASSEM M. et al. Histological Evaluation of the Effect of Using Growth Hormone Around Immediate Dental Implants in Fresh Extraction Sockets: An Experimental Study, *Implant Dentistry / VOLUME 20, NUMBER 1*. 2011

[57] ABREU, M.E. **Hormônio Do Crescimento No Processo De Osseointegração De Implantes De Titânio - Estudo Experimental E Revisão De Literatura**, Porto Alegre 2011. Tese de Doutorado –Faculdade de Odontologia da PUCRS.

[58] GARCÍA J.T, Dorta JM, Munguía O, Llabrés M, Fariña JB. Biodegradable laminar implants for sustained release of recombinant human growth hormone. **Biomaterials**. 2002; 23: 4759-64

[59] LYNCH, S. E. et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. **J Periodontol**. 1991 Nov; 62 (11): 710-6.

[60] STEFANI, C. M. et al. Platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1 combination and bone regeneration around implants placed into extraction sockets: a histometric study in dogs. **Implant Dent**. 2000; 9 (2): 126-31.

[61] TRESGUERRES, I. F. et al. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. **Clin Oral Implants Res**. 2002 Dec; 13 (6): 631-6.

[62] PASCHALI, E. P, Fourier transform infrared analysis and bone. **Osteoporos Int** 20:1043–1047,2009.

[63] CUNHA. A. A Surgical Procedure Using Sheep As An Animal Model To Evaluate Osseointegration, **Rev. Clín. Pesq. Odontol**. 2007

[64] MUYONGA, J.H. et al. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*) **Food Chemistry** 86 ,2004.

[65] FILHO. E. A et al. Biomateriais: Deposição De Hidroxiapatita Sobre Superfície De Ti-Cp Modificada Por Aspersão Térmica. *Quim. Nova*, 2007.

ANEXOS

Anexo 1. Carta de aprovação do CEUA.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 164/10 – CEUA

Porto Alegre, 07 de outubro de 2010.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 10/00165, intitulado: **“Avaliação do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) no processo de osseointegração de implantes de titânio submetidos a diferentes tratamentos de superfície”**, com as recomendações em anexo.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,


Prof.ª. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Rogério Pagnoncelli
Faculdade de Odontologia
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

AVALIAÇÃO DE PROJETOS DE PESQUISA

TÍTULO DO PROJETO
Avaliação do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) no processo de osseointegração de implantes de titânio submetidos a diferentes tratamentos de superfície.
Projeto nº 10/00165
Pesquisador: Rogério Pagnoncelli
AVALIAÇÃO GERAL DO PROJETO
<input type="checkbox"/> Aprovado <input checked="" type="checkbox"/> Aprovado com recomendação <input type="checkbox"/> Pendente <input type="checkbox"/> Não aprovado
Questões levantadas pelo CEUA – PUCRS
<p>Foram acrescentados e esclarecidos os itens (cálculo do tamanho da amostra e eutanásia).</p> <p>O cronograma, bem como o orçamento, foram reelaborados, conforme as sugestões.</p> <p>O CEUA sugere, porém, que nas próximas submissões o pesquisador anexe uma carta com as respostas e modificações realizadas no corpo do texto.</p>

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

Anexo 2. Projeto Piloto.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE IMPLANTES NANOTEXTURIZADOS DE TITÂNIO ASSOCIADO AO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO (rhGH)

P.P.Veleda*, M. E. R. Abreu**, R. M. Pagnoncelli** e R. Hubler*

*Faculdade de Física/LMN/GEPSI/PUCRS, Porto Alegre, Brasil

**Faculdade de Odontologia/PUCRS, Porto Alegre, Brasil

e-mail:paulapve@hotmail.com

Abstract: The objective of this work is to characterize the process of osseointegration with different surface treatments (as machined, plasma spray and plasma spray nanotextured) with the use of recombinant human growth hormone (rhGH). The implants were made of pure titanium in a cylindrical shape and placed in the tibia of rabbits. The samples were analyzed by wavelength x-ray fluorescence (W-XRF), optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM), and infrared microscopy (μ -FTIR). The results show a strong formation of new bone around all implants, specially the nanostructured one.

Palavras-chave: Implats, Titanium, Osseointegration, characterization.

Introdução

O titânio e suas ligas são amplamente aplicados para a confecção de implantes odontológicos e ortopédicos devido sua excelente osseocondução sem a interposição de tecido inflamatório crônico ou conjuntivo [1]. Essa característica de interação do titânio com o tecido ósseo iniciou a revolução da implantodontia com os trabalhos de Branemark [1] e gerou a origem do termo osseointegração [2].

Devido ao grande uso do titânio em implantes, diversos pesquisadores e empresas têm investido na busca de soluções para reduzir o período para que ocorra a osseointegração. Uma das alternativas mais estudadas é o desenvolvimento de implantes com variadas formas e diferentes tratamentos de superfície [3-4]. Com a polimerização em cadeia foi possível sintetizar substâncias endógenas, dentre as quais o hormônio do crescimento (GH) [3].

O GH é produzido pela adenohipófise ao longo de toda a vida e tem como principais ações regular o anabolismo de proteínas e o catabolismo de ácidos graxos. O GH é responsável, no período de crescimento do indivíduo, pela sua estatura final [5].

Dentre os principais fatores para o sucesso de um implante, podemos destacar a biocompatibilidade, a estabilidade primária e a osseointegração, sendo que esta última é responsável pela vida útil do implante e

pela liberação do uso de carga mecânica. Assim, quanto mais rápida e efetiva for a osseointegração de um implante, mais rápido também será a liberação do paciente para as atividades normais, diminuindo assim os transtornos pós-cirúrgicos e os custos com revisões.

Devido ao efeito sistêmico do rhGH, uma aplicação massiva apenas durante a cirurgia não trará os efeitos desejados. Por este motivo pesquisadores tem aplicado doses regulares durante o tempo de osseointegração, dando margem aos efeitos colaterais do hormônio. Uma possível solução a ser testada seria a liberação gradual do rhGH no local do implante para verificar se o efeito pode ser predominantemente tóxico.

O objetivo desse trabalho é a produção de implantes com superfície nanotexturizada para a liberação controlada de rhGH e a caracterização do processo de osseointegração entre implantes de titânio com diferentes tratamentos de superfície com a utilização do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH).

Materiais e Métodos

Os implantes foram fabricados a partir de titânio comercialmente puro (ASTM Grau 2) fornecidos pela empresa BAUMER SA. Os implantes foram usinados em formato cilíndrico, liso e sem rosca, com diâmetro de 2 mm e comprimento de 6 mm. Dos 6 mm de comprimento dos implantes, 4 mm serão inseridos no defeito ósseo e 2 mm ficarão supra-ósseos, o que facilitará sua inserção e posterior localização. Antes da deposição de titânio poroso (PSA) os implantes foram atacados com ácido fluorídrico 10 % em volume para manter a dimensão após a deposição como mostrado na Figura 1-a. Os implantes foram separados em três grupos: superfície lisa, jateamento plasma spray de titânio (PSA) e PSA nanotexturizada. A deposição PSA foi feita pela empresa Baumer S.A. e as nanotexturas foram produzidas em sala limpa certificada P4 no Laboratório de Materiais e Nanociências da PUCRS (LMN/GEPSI/PUCRS) conforme descrito nas referências [6-8]. A fotografia do implante após a textura está mostrada na Figura 1-b. Após a limpeza final dos implantes em estufa a vácuo, os mesmos foram

embalados e esterilizados com ETO e armazenados até a data da cirurgia.

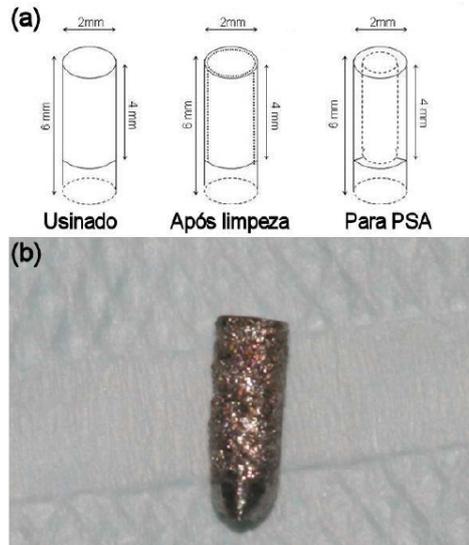


Figura 1 – (a) Representação esquemática dos implantes (b) fotografia do implante PSA-nano pronto para embalagem.

Para este estudo foi utilizado um coelho macho adulto da linhagem Nova Zelândia. No procedimento cirúrgico, inicialmente o animal recebeu medicação pré-anestésica via intramuscular.

Após constatada anestesia, as patas traseiras direita e esquerda foram tricotomizadas e infiltradas com anestésico local na região médio-distal da tibia, para diminuir o sangramento trans-operatório e controle profilático da dor pós-operatória. Uma incisão na pele de 3 cm foi realizada na região ântero-proximal das tibias, expondo-se sua região médio-distal, onde foram preparadas três cavidades ósseas de 2 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade sob irrigação abundante de soro fisiológico 0.9%.

Foi utilizado nesse estudo o hormônio do crescimento humano recombinante (Biomatrop®, Aché, São Paulo, Brasil), sob forma de pó liofilizado (frasco-ampola), em que, conforme informações na bula do fármaco, cada frasco-ampola contém 2 UI de rhGH, e excipientes de glicina, fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio monobásico. O rhGH foi aplicado apenas no momento da cirurgia, nenhuma dose extra foi ministrada durante o período de cura dos animais.

As tibias dos coelhos foram dissecadas, removidas e armazenadas em glutaraldeído a 2% e posteriormente liofilizadas a vácuo com banhos sucessivos de álcool de 10 % vol. até álcool absoluto. Após a liofilização as amostras foram embutidas em resina acrílica para possibilitar o lixamento e o polimento.

O lixamento foi realizado de forma manual com uma seqüência de lixas da gramatura desde 180 até 4000, fixas em bloco de vidro e sob irrigação com água corrente e posteriormente o polimento foi realizado em politriz com pasta de diamante de 9 mm, 1mm e 0.25 mm em seqüência e com irrigação constante com uma mistura de álcool isopropílico/álcool glicólico 50%/50%. O objetivo deste preparo foi a obtenção de uma superfície polida no sítio da DO e nas suas adjacências, mantendo as características da parte mineral e do implante para posterior observação microscópica. A composição das amostras foi obtida por Fluorescência de Raios X (XRF), em um equipamento Shimadzu XRF-1800 e microscopia no infra-vermelho (m-FTIR) em um equipamento Shimadzu Prestige 21. A microestrutura dos implantes e a qualidade do osso neoformado foram avaliados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e microscopia óptica (MO). A análise qualitativa do tecido ósseo periimplantar foi obtida por MEV usando um equipamento Phillips XL 30 e um MO Olympus BX-60 com câmera de 14 Mpixels.

Resultados

As análises do material base mostraram que a composição dos implantes antes dos tratamentos atendia a norma ASTM para titânio grau 2 e após a deposição da camada porosa apresentou um teor de oxigênio inferior a 1 at.%, contudo nenhum traço de flúor ou fósforo foi observado. A Figura 2 mostra a superfície dos implantes após cada etapa do processamento. A Figura 2-a mostra a superfície como usinada, a Figura 2-b após o ataque ácido, a Figura 2-c a superfície PSA e a Figura 2-d a superfície PSA-nano, mostrando o aumento significativo da área superficial pela aplicação da nanotextura.

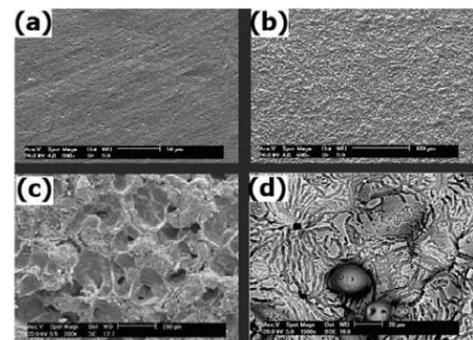


Figura 2 – Micrografias da superfície dos implantes (a) como usinado, (b) após o ataque ácido, (c) após a deposição da camada porosa de Ti e (d) após a nanotexturização.

Ao término de um período de 30 dias do projeto piloto, todos os implantes que receberam rhGH ficaram firmemente aderidos ao osso mostrando uma forte

osseointegração. A Figura 3 mostra a fotografia da tibia onde podemos observar os implantes PSA-nano, PSA e como usinado bem como o calo ósseo formado ao redor dos mesmos. Após a dissecação e liofilização das tibias, as mesmas foram embutidas em resina acrílica de poliéster e curadas em estufa a vácuo para que a resina penetrasse nos espaços vazios do osso, permitindo um polimento de elevada qualidade. A Figura 4-a mostra o conjunto de tibia com três implantes após o embutimento e a Figura 4-b um dos implantes após o corte e a etapa de polimento.

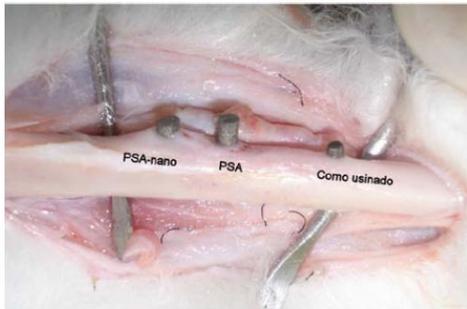


Figura 3 – Fotografia da tibia do coelho após o período 30 dias mostrando os implantes liso, PSA E PSA-nano.

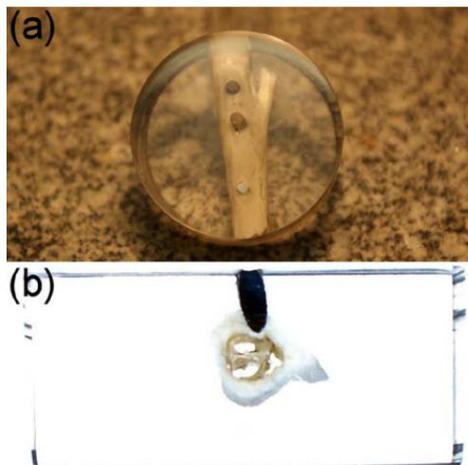


Figura 4 – (a) fotografia da tibia com três implantes e (b) conjunto osso-implante após corte e polimento.

A Figura 5-a mostra a interface osso-implante com magnificação de 50X onde a linha vermelha corresponde a linha incremental do osso neoformado e a Figura 5-b mostra esta interface com magnificação de 500X permitindo observar a estrutura do osso neoformado e sua morfologia. As análises de μ -FTIR e XRF mostraram que a composição do osso neoformado corresponde a razão cálcio-fósforo da hidroxiapatita

bem como as ligações químicas presentes correspondem a esta fase, sem diferenciar a região neoformada da região de osso antigo.

Discussão

O projeto de implantes lisos, mesmo oferecendo uma menor fixação primária que implantes rosqueáveis, mostrou ser bastante eficiente para a osseointegração. Assim como apresentado por Ghéhenec e coautores, o tipo de tratamento superficial foi decisivo para acelerar o processo de fixação do implante ao osso. Karlsson e colaboradores mostraram que, alterando a superfície de um mesmo modelo de implante, a dinâmica de osseointegração depende fortemente do tipo de tratamento superficial e Renz e coautores mostraram que este fator está relacionado com a rugosidade e com a área de contato implante-meio fisiológico.

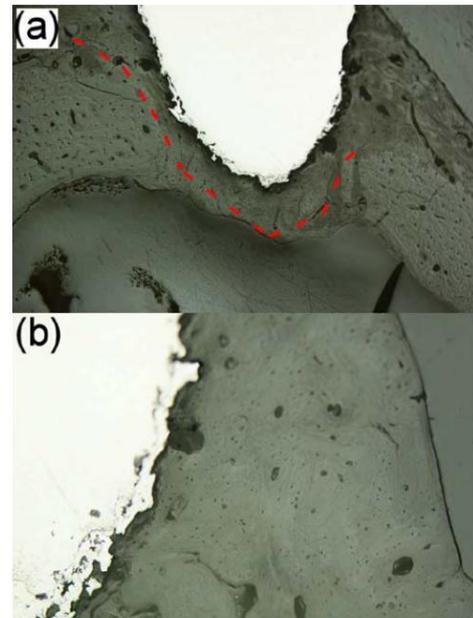


Figura 5 – (a) fotografia da interface osso-implante com magnificação de 50X e (b) detalhe da interface com magnificação de 500X.

Lan mostrou em seu trabalho que a aplicação de hormônio de crescimento é eficiente na ativação do processo osteoblástico permitindo que implantes com a mesma superfície tenham resultados diferentes. Neste trabalho mostramos que os dois fatores são independentes. Em um mesmo animal é possível observar uma diferença significativa entre implantes tratados com rhGH mas com superfícies diferentes como pode ser visto na Figura 3. Além do efeito

sistêmico do hormônio, mas também pela metodologia cirúrgica onde colocamos em cada loja óssea a mesma quantidade de rhGH, fica claro que o calo ósseo formado ao redor do implante PSA-nano é visivelmente maior que no implante adjacente sem a nanotexturização. Estes resultados indicam que pode haver liberação gradual do hormônio armazenado na superfície nano gerando também um efeito tópico.

Hübler e coautores mostraram que o processo de avaliação do osso após liofilização e polimento traz resultados complementares as avaliações histológicas como o HE, mostrando como a parte mineral do osso neoformado está associada ao osso antigo e as regiões que sofreram o tratamento. Neste trabalho foi possível observar que em um período de apenas 30 dias há uma forte ligação osso-implante praticamente sem apresentar lacuna intersticial. A Figura 5 mostra que as camadas de osso neoformado estão intimamente em contato com o implante sugerindo que a fixação do mesmo é bastante efetiva.

Assim como feito nos trabalhos de Renz e Cunha, novos grupos de implantes serão preparados para testes de tração visando avaliar quantitativamente a osseointegração dos implantes.

Conclusão

Os resultados obtidos mostram que os implantes com uma superfície nanotexturizada permite a liberação gradual de rhGH que permite um efeito tópico do medicamento, pois mesmo com os três tipos de implante instalados na mesma tibia, o PSA-nano mostrou a formação de um calo ósseo bem mais proeminente que os demais.

Agradecimentos

Os autores agradecem as equipes do Biotério da UFSC pelo acompanhamento dos animais, ao Centro de Microscopia da PUCRS (CEMM-PUCRS) pelas imagens de microscopia e as agências de fomento CAPES e CNPq pelo apoio prestado a este projeto.

Referências

- [1] Branemark, P. I. *et al.* (1977) "Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period". *Scand J Plast Reconst Surg; II (suppl.):* 16.
- [2] Lan, J. *et al.* (2006) "The effect of combination of recombinant human bone morphometric protein-2 and basic fibroblast growth factor or insulin – like growth factor – I on dental implant osseointegration by confocal laser scanning microscopy". *J Periodontol.* 77 (3): 357-63.
- [3]] LE Ghéhenec, L. *et al.* (2007) "Surface Treatment of titanium dental implants for rapid osseointegration". *Dental Materials.* 23: 844-54.
- [4] Karlsson, U.; Gotfredsen, K.; Olsson, C. (1998) "A 2-year report on maxillary and mandibular fixed partial dentures supported by Astra tech dental implants. A comparison of two implants with different surfaces." *Clin Oral Implants Res* 9: 91-9.
- [5] Giavaresi G. *et al.* (2003) "Mechanical and histomorphometric evaluations of titanium implants with different surface treatments inserted in sheep cortical bone". *Biomaterials.* 24(9):1583-94.
- [6] Renz, R.P.; Cunha, A. Wantowsky, G.; Blando, E.; Hübler, R. (2007) "Osseointegration evaluation of treated surfaces of titanium implants applying tensile pull out test". *Rev. Clín. Odont v. 3, p. 149-157.*
- [7] Cunha, A.; Renz, R.P.; Wantowski, G.; Oliveira, R. B.; Blando, E.; Hübler, R. (2007) "A surgical procedure using sheep as an animal model to evaluate osseointegration". *Rev. Clín. Pesq. Odont v. 3, p. 59-62.*
- [8] Hübler, R.; *et al.* (2010) "Effects of low-level laser therapy on bone formed after distraction osteogenesis". *Lasers in Medical Science, v. 25, p. 213-9.*

