



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

PROTOCOLO DE PRESERVAÇÃO ÓSSEA PARA AVALIAÇÃO DE
TECIDO ÓSSEO E OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DE
TITÂNIO

MARCEL FERREIRA KUNRATH

CIRURGIÃO - DENTISTA

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTO HUBLER

Dissertação de Mestrado 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 Mestre/Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

Porto Alegre

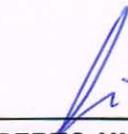
Janeiro, 2016



PROTOCOLO DE PRESERVAÇÃO ÓSSEA PARA AVALIAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO E OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DE TITÂNIO

CANDIDATO: MARCEL FERREIRA KUNRATH

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

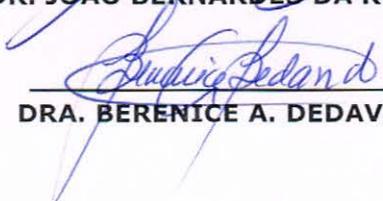


DR. ROBERTO HUBLER - ORIENTADOR

BANCA EXAMINADORA



DR. JOÃO BERNARDES DA ROCHA FILHO - DO PPGECEM - PUCRS



DRA. BERENICE A. DEDAUID - DO PGETEMA/FENG - PUCRS

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, em especial aos meus pais, Ângela Antonia Ferreira Kunrath e Jorge Luiz Kunrath, que sempre me apoiaram e me aconselharam em toda minha vida de estudos, sem me deixar faltarem oportunidades e suporte para todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares: minha mãe, Ângela, meu pai, Jorge e a minha irmã Rafaela, pelo apoio e companhia familiar em todo este percurso.

Agradeço ao professor orientador Roberto Hubler, pela oportunidade de trabalho junto ao seu laboratório, conselhos, suporte para o trabalho, acompanhamento e pela parceria excelente.

Ao pessoal do Laboratório GEPSI, em especial ao André e a Renata, por me ajudarem nas dificuldades do curso que me engajei e apoio na pesquisa.

Agradeço ao pessoal do meu trabalho, Antonio Martins e Luciano Martins, pela compreensão de algumas ausências em nossa equipe de trabalho.

Agradeço a PUCRS pelo espaço e oportunidade de trabalho dentro de seus campos.

Agradeço a cooperação com Hewlett Packard Brasil Ltda. e com recursos provenientes da Lei da Informática (Lei nº 8.248, de 1991) para alcançar os presentes resultados do trabalho.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	3
AGRADECIMENTOS.....	4
SUMÁRIO.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE SÍMBOLOS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivos Específicos.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 Tecido Ósseo.....	17
3.2 Inflamação e Reparo Tecidual.....	18
3.2.1 Inflamação.....	19
3.2.1.1 Inflamação Aguda.....	20
3.2.1.2 Inflamação Crônica.....	21
3.2.2 Reparo Tecidual.....	21
3.2.2.1 Reparo Ósseo.....	22
3.3 Biocompatibilidade e Titânio.....	23
3.3.1 Biocompatibilidade.....	23

3.3.2 Titânio.....	24
3.4 Implantes Osseointegráveis.....	25
3.5 Superfícies Modificadas.....	27
3.5.1 Contato Osso-Implante ou BIC.....	31
3.6 Métodos para Caracterização	33
3.6.1 Imagem (MO)	33
3.6.2 Técnicas Histológicas.....	34
4. METODOLOGIA.....	37
4.1 Considerações Éticas.....	37
4.2 Confeção e Caracterização dos Implantes.....	37
4.3 Modelo Animal.....	38
4.4 Procedimento Cirúrgico.....	39
4.5 Fluxograma da Metodologia.....	41
4.6 Preparação das Amostras para Observação Microscópica e Histológica.....	42
4.6.1 Preparação pelo Protocolo de Preservação.....	42
4.6.2 Preparação pelo Método de Coloração por HE.....	43
4.7 Análises pelo Protocolo de Preservação e Histologia.....	44
4.7.1 Análise das Amostras sem Implantes.....	44
4.7.2 Análise das Amostras com Implantes.....	45
5. RESULTADOS.....	46
5.1 Avaliação e comparação da amostragem sem implantes.....	46
5.2 Avaliação e comparação da amostragem com implantes.....	52

6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÕES.....	61
8. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	63
9. REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Representação do comportamento celular e vascular durante e após acontecimento de uma inflamação aguda ou crônica. [18] – página:20

Figura 3.2. Representação das fases do reparo ósseo. [19] – página: 23

Figura 4.1. a) Fotografia do implante PSA-nano pronto para embalagem e (b) micrografia da superfície mostrando os microcanais e as nanotexturas em seu interior. – Página: 38

Figura 4.2. Região da mandíbula utilizada para as amostras e amostras pelo protocolo de preservação óssea e técnica histológica. – Página: 40

Figura 4.3. Amostra confeccionada pelo protocolo de preservação óssea. – Página: 43

Figura 5.1. Tecido ósseo visualizado pela técnica histológica. – Página: 47

Figura 5.2. Tecido ósseo visualizado pelo protocolo de preservação óssea. – Página: 49

Figura 5.3 A e B. Região semelhante do tecido ósseo mandibular mostrada por técnicas diferentes (protocolo de preservação [B] e técnica histológica [A]). – Página: 50

Figura 5.4 A e B. Região semelhante do tecido ósseo mandibular mostrada por técnicas diferentes (protocolo de preservação [A] e técnica histológica [B]). – Página: 51

Figura 5.5. Osso aderido à superfície do implante após remoção com uso de ultrassom. – Página: 53

Figura 5.6 A e B. Imagem comparativa entre tecido ósseo com região de implante confeccionado pelo protocolo de preservação óssea (A) e tecido ósseo com região de implante confeccionado por técnica histológica. – Página: 54

Figura 5.7. Região de detalhe do contato osso-implante pelo protocolo de preservação óssea. – Página: 55

LISTA DE SÍMBOLOS

BIC - Contato Osso-Implante (Bone Implant Contact)

HA - Hidroxiapatita

HE - Hematoxilina - Eosina

MO - Microscopia Óptica

P&D - Pesquisa e Desenvolvimento

Ti-CP - Titânio Comercialmente puro

SLA - Tratamento de superfície, jateamento com partículas grandes de areia e ataque ácido (Sandblasted, large-grit, acid-etched).

SLAactive - Implante da marca Straumann® com superfície modificada

XPS - Espectroscopia Fotoeletrônica de Raios X (X-Ray Photoelectron Spectroscopy).

RESUMO

KUNRATH, Marcel F. **Protocolo de Preservação Óssea para Avaliação de Tecido Ósseo e Osseointegração de Implantes de Titânio**. Porto Alegre-RS. 2015. Dissertação. Programa De Pós-Graduação Em Engenharia E Tecnologia De Materiais, Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul

Com a crescente expansão de superfícies de implantes e a necessidade de maior velocidade de osseointegração, métodos de análise do tecido ósseo, análises da superfície de implantes e a qualidade do contato osso-implante (BIC) estão cada vez mais sendo explorados pelos pesquisadores. O objetivo do presente estudo foi descrever detalhadamente um protocolo de preservação óssea para confecção de amostras com e sem implantes, sem causar danos ou avarias nem ao tecido ósseo nem às propriedades do metal, preservando o BIC. Em uma segunda etapa, as amostras confeccionadas pelo protocolo de preservação óssea foram comparadas com as amostras preparadas pelo método de análise histológica por coloração por Hematoxilina-Eosina, considerado padrão ouro para tecidos vivos. Foram utilizadas oito amostras de tecido ósseo com implantes de tíbias de coelhos e, mais quatro fragmentos de mandíbulas sem implantes, dos mesmos coelhos. As amostras com e sem implantes foram confeccionadas pelos dois protocolos e, após a preparação dos corpos de prova, foram feitas as análises por microscopia óptica de transmissão e reflexão através de imagens digitalizadas. Cada protocolo apresentou vantagens quando os resultados foram analisados individualmente nas amostras sem implantes. Porém, para as amostras com implantes, a análise apenas pelo método histológico não conseguiu apresentar bons resultados, enquanto que o método de preservação óssea mostrou excelentes resultados para análise de osseointegração, neoformação óssea e interface osso-implante. Conclui-se que o protocolo de preservação óssea desenvolvido mostrou-se um excelente método para análise de amostras com implantes, e que pode ser complementar à histologia, em análises de tecido ósseo sem implantes. O método histológico não mostrou-se suficiente para análise de neoformação óssea e interface osso-implante.

Palavras chaves: Implantes; Osseointegração; Titânio; BIC; Tecido ósseo

ABSTRACT

KUNRATH, Marcel F. **Protocol of Bone Preservation for Evaluation of Bone Tissue and Osseointegration of Titanium Implants.** Porto Alegre. 2015. Master. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, Pontifical Catholic University of Rio Grande Do Sul

With the growing expansion of implant surfaces and the need for greater speed of osseointegration, methods of analysis of bone tissue and implant surface as well as the quality of the bone implant contact (BIC), they are increasingly being explored by researchers. The aim of this study is to show detail and describe a bone preservation protocol for making implants samples with and without implants without any harm or damage, or the bone tissue or the properties of the metal, preserving the BIC. In a second step, the samples prepared by the protocol preservation were compared with those made by histological analysis method for staining for HE, considered the gold standard for living tissue. Eight samples were used for bone tissue with implants in rabbit tibia and more four fragments of jaws without implants of the same rabbits. Samples with and without implants were made by the two protocols, after preparation of the test specimens, analysis by optical microscopy of transmission and reflection through scanned images were made. Each protocol had advantages when the results were analyzed individually in the implants without samples, becoming further analysis. However, for samples with implants, analysis only by histological method cannot bring good results, while the bone preservation method showed excellent results for osseointegration analysis, bone formation and bone implant interface. It follows that the bone preservation protocol is an excellent method for analyzing samples with implants, and can be complementary to histology, in analysis bone samples without implants. The histological method is not sufficient for analysis of bone formation and bone implant interface.

Keywords: Implants; Osseointegration; Titanium; BIC; Bone

1INTRODUÇÃO

A rápida evolução, dos implantes e o tratamento das suas superfícies, instiga pesquisadores e empresas da área biomédica ao estudo e desenvolvimentos de novas superfícies, buscando melhorar e acelerar a osseointegração. Estima-se que, só em 2015, mais de três milhões de brasileiros busquem por algum tipo de implante, seja ele ortopédico ou odontológico.

Os trabalhos iniciais sobre osseointegração, desenvolvidos pela equipe do professor Brånemark[1], foram realizados utilizando-se implantes de titânio comercialmente puro (Ti-CP) com acabamento de superfície apenas usinado. Os implantes foram instalados na região anterior da mandíbula ou maxila, unidos para uma melhor distribuição das cargas mastigatórias e utilizados para reabilitações de pacientes edentados totais.

O sucesso dessa modalidade levou a uma extrapolação da técnica, e a partir de certo momento, passou a ser utilizada para reabilitações de pacientes edentados em diversas situações. Contudo, quando a instalação de implantes foi feita em regiões de pior qualidade óssea (como a região posterior de maxila) as altas taxas de sucesso não seguiram com a mesma porcentagem a longo prazo. Estes piores resultados e a busca por tempos de cicatrização cada vez menores estimularam os centros de P&D de empresas e universidades à pesquisa e ao desenvolvimento de novas superfícies de implantes[2].

Com o objetivo de aumentar a superfície e a força de adesão na interface osso-implante, diferentes métodos de modificação de superfície têm sido propostos. A maioria destes métodos são baseados na alteração topográfica do implante, aumentando sua área superficial (rugosidade) e,

principalmente, sua hidrofiliçidade (diminuiçãõ do ângulo de contato). Além de acelerar o fenômeno de reparaçãõ do osso, os implantes devem influenciar positivamente na formaçãõ de matriz óssea em contato, e fazer com que esse osso novo tenha composiçãõ, estrutura e propriedades biomecânicas adequadas e semelhantes àquelas da matriz óssea original. Isto induz a um grande diferencial na diminuiçãõ do tempo de tratamento, aumento da casuística de sucesso, diminuiçãõ de custos clínicos e maior aprovaçãõ do paciente. [2]

Desta forma, o uso de técnicas de caracterizaçãõ que permitam avaliar com acurácia qualitativa e quantitativamente estes implantes é de suma importância, de modo que pesquisadores precisaram lançar mão de técnicas novas para avaliar a osseointegraçãõ. Além dos tradicionais testes de contra-torque [3-4], estudos usando microtomografia [5] e testes de pull-off e push-out [6,7,8], a percepçãõ do cirurgião, o torque de inserçãõ, o torque de assentamento, o teste de percussãõ, avaliaçãõ de mobilidade, análise de frequência de ressonância e avaliaçãõ imaginológica foram necessários para avaliar a verdadeira grandeza da osseointegraçãõ e permitir diferenciar quantitativamente o grau de osseointegraçãõ em superfícies com diferentes tratamentos.

Além dos métodos supracitados, a avaliaçãõ óssea perimplantar, pode ser estudada pela análise histomorfométrica por observaçãõ microscópica [9-10]. Entretanto, devido à particularidade de preparo das lâminas histológicas (que será discutido neste estudo), se faz necessária a retirada do implante com o tecido ósseo circunjacente. Por se tratar de uma metodologia destrutiva, somente é passível de aplicaçãõ em pesquisas com animais, isto é, através de estudos “in-vivo”.

Para a avaliaçãõ por microscopia óptica tem sido preconizada a confecçãõ de lâminas histológicas coradas pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE) e Picrosirius-Red[11], permitindo a quantificaçãõ de tecido ósseo e de fibras colágenas.

Para uma avaliação qualitativa e quantitativa da osseointegração ainda são necessários estudos histomorfométricos do osso na região adjacente ao implante. Contudo é muito difícil obter uma lâmina com boa qualidade sem a remoção prévia do implante, uma vez que o metal dificulta e gera imperfeições quando é feito o ataque ácido no osso para desmineralizá-lo. Por outro lado, a retirada do implante do osso acaba removendo toda a camada de osso neoformada impedindo a observação real da interface osso-implante bem como avaliar parâmetros fundamentais relativos à osseointegração, como o contato osso-implante (BIC), o grau de maturação do osso neoformado ao redor do implante e a formação de osso novo dentro das porosidades da superfície do implante.

Outras técnicas e métodos de caracterização são necessários para auxiliar e melhorar essa avaliação crítica da osseointegração. O presente estudo propõe o uso de um protocolo de preparação de amostras de tecido ósseo, o qual será descrito com detalhes, no capítulo 4. Pelo método proposto, a retirada do implante não é necessária de modo que todo o osso neoformado bem como a interface osso-implante são preservadas e as principais características para avaliação da osseointegração podem ser avaliadas.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo demonstrar e descrever um protocolo de preparação de amostras de tecido ósseo, com e sem implantes de titânio, para o estudo da osseointegração de implantes de titânio.

2.1 Objetivos Específicos:

- Comparar análises de amostras preparadas pelo protocolo proposto com amostras preparadas por histologia com coloração por HE do tecido ósseo com e sem implantes ou qualquer agressão ao tecido;
- Verificar a viabilidade de uso do protocolo de preparação de amostras proposto para observação das características do tecido ósseo, do contato osso-implante (BIC); superfície do implante e suas modificações e formação óssea in loco sem a retirada do implante.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O entendimento da osseointegração e das características dos implantes depende de um conjunto de conhecimentos básicos que passam desde a fisiologia básica do corpo humano até tecnologias avançadas de manipulação de materiais metálicos e químicos.

Esses conhecimentos devem ser pensados em uma sequência lógica para que se possa estudar o que, realmente, acontece na prática. Iniciando-se no organismo receptor e sua resposta ao material, até analisar o material usado e suas características, e por fim, os métodos de como podemos avaliar o resultado desta junção entre organismo e material.

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 fósforo no organismo [14-15].

Os ossos são revestidos, em suas superfícies externa e interna, por membranas conjuntivas ricamente vascularizadas, denominadas perióstio e endóstio, 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 endóstio e do perióstio ramificam-se e penetram nos ossos através de canais, encontrados na matriz óssea. [14]

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 [16]. Da mesma forma, o colágeno tipo I, responsável por 90% da constituição protéica óssea, participa desse processo de mineralização da matriz óssea, servindo como uma espécie de arcabouço. [16]

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[17].

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 [17].

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 [17]. O desenho esquemático da figura 3.1 mostra maiores detalhes da inflamação aguda e crônica.

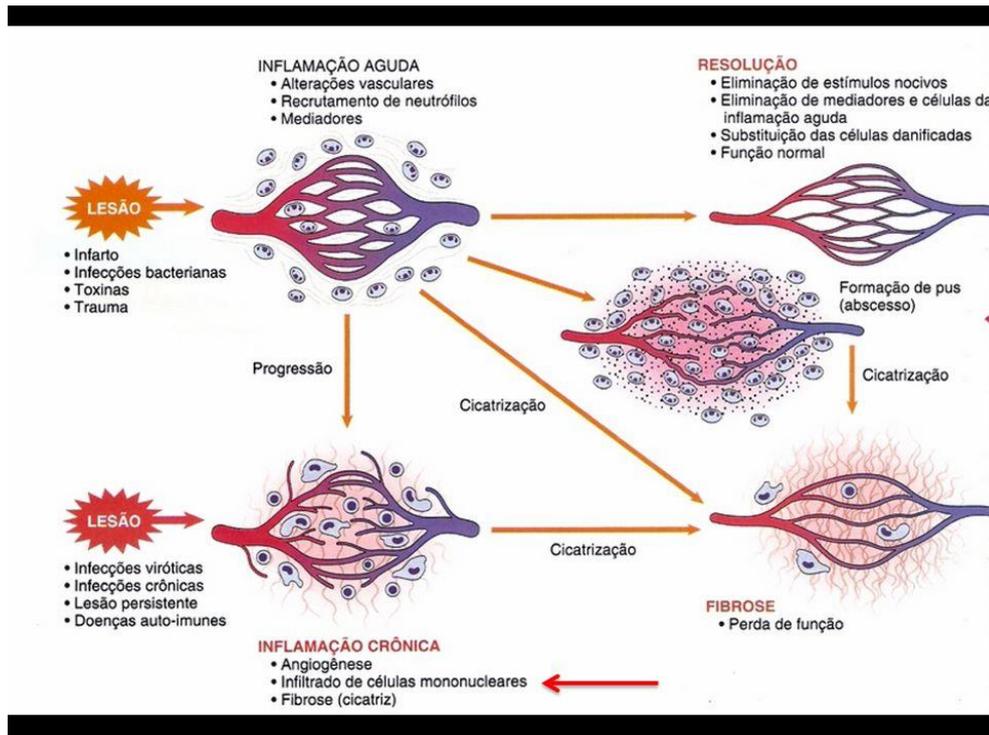


Figura 3.1 - Representação do comportamento celular e vascular durante e após os dois tipos de inflamação. [18]

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. 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. O aumento da permeabilidade vascular acarreta no acúmulo de fluido extravascular rico em proteínas que, por sua vez, forma o líquido extravascular inflamatório. [17]

Esses componentes contribuem para os clássicos sinais de inflamação: calor, rubor, tumor e dor.

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. [17]

Outras vinte e cinco 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. [17]

3.2.2. Reparo Tecidual

Todo reparo inicia-se através de um processo inflamatório e pode ocorrer tanto por regeneração, quanto por cicatrização.

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.

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, 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. 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, em que os osteoblastos depositam nova matriz óssea aderida às partículas enxertadas [14]. A figura 3.2 representa as fases do reparo e a formação do calo ósseo.

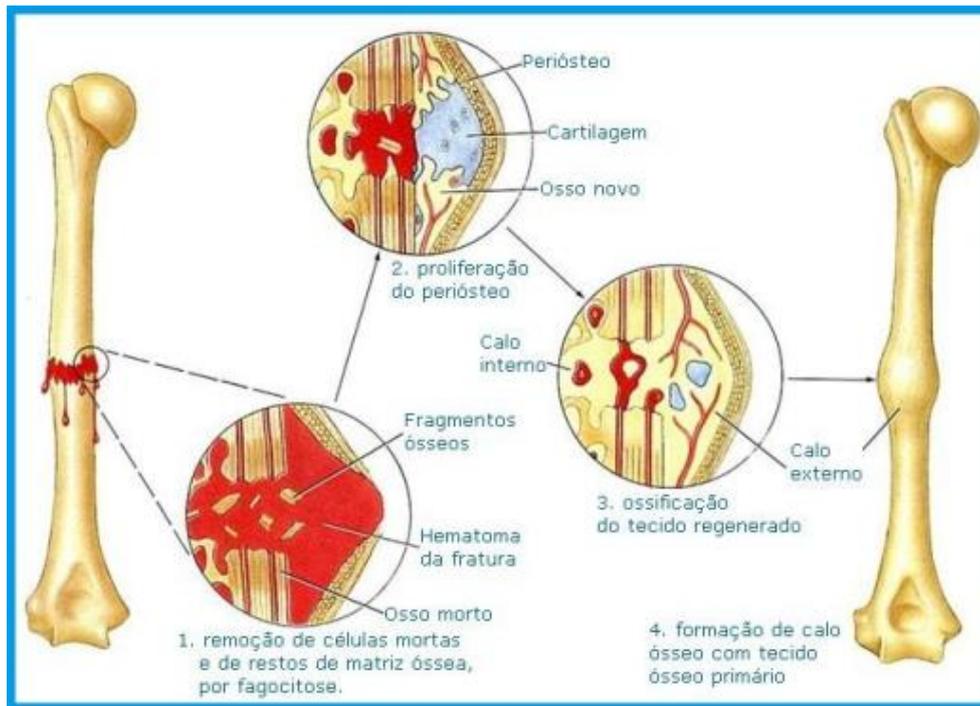


Figura 3.2 - Representação das fases do reparo ósseo. [19]

3.3 Biocompatibilidade e Titânio

3.3.1 Biocompatibilidade

Um material biocompatível é capaz de produzir uma resposta apropriada no hospedeiro, quando usado em uma aplicação específica. No caso de um implante ósseo, é a capacidade de o material induzir a formação de um novo tecido ósseo pela diferenciação de células osteoprogenitoras.

Para ser definido como biocompatível, o material usado como implante permanente deve ser resistente aos ataques degradativos ou corrosivos por fluidos fisiológicos; o implante não poderá modificar a composição eletrolítica do tecido ou do plasma onde será instalado; não deverá interferir no sistema de defesa do organismo; não deverá proporcionar qualquer trauma sanguíneo; deve preservar a natureza das proteínas do plasma; deverá ser conformado de forma anatomicamente adequada e os constituintes do material devem suportar as solicitações sem ocorrência de fadiga ou fratura catastrófica durante o tempo de vida útil estimado do implante. [20-21]

3.3.2 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 um material biocompatível, 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. Quimicamente, a camada de óxido consiste de vários óxidos (TiO₂, TiO, TiO₅), porém o TiO₂ predomina. [22-23]

Várias pesquisas histológicas demonstraram a excelente integração dos implantes de titânio com 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 [22,23].

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 [23].

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 [23].

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, causando 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 Implantes Osseointegráveis

Branemark e colaboradores descreveram uma nova modalidade de tratamento para reabilitar a perda de elementos dentais. Um implante osseointegrado é caracterizado pela aposição direta de osso sobre a superfície de titânio do implante, sem evidência de uma camada de tecido conjuntivo entre o osso e o implante. Esse tecido ósseo, circunjacente à superfície do implante, apresenta características normais de osso vivo, com osteócitos e canais vasculares. [25-26]

Dados oriundos da Implantodontia demonstram que o sucesso clínico dos implantes está diretamente associado ao fenômeno da osseointegração, definido por diversos autores como “uma conexão direta e estrutural entre um tecido ósseo vivo e organizado e um implante funcional” [15,27-29].

Os mecanismos pelos quais os implantes endósseos de titânio se integram ao osso podem ser divididos em três diferentes fenômenos: a

osteocondução, a neoformação óssea e a remodelação. Durante a fase de osteocondução ocorre a migração de células osteogênicas em diferenciação, provenientes de tecido ósseo vizinho e tecido conjuntivo perivascular indiferenciado, para a superfície do material. A migração das células ocorre através da rede de fibrina que se forma pela resolução do coágulo sanguíneo presente entre o osso e o implante. Assim, a superfície do implante se torna colonizada por uma população de células osteogênicas antes do início da produção de matriz óssea. A seguir, inicia-se a neoformação óssea, a partir da secreção de uma matriz orgânica sem colágeno pelas células osteogênicas. Tal matriz, constituída principalmente pelas proteínas, fornece sítios para a nucleação de fosfato e cálcio, sendo seguida pela formação de cristais, e só então haverá a formação do colágeno a sua subsequente mineralização. A terceira fase de cicatrização, a remodelação óssea, é de particular importância para a estabilidade em longo prazo de um implante [15,27-29].

Após a implantação, os eventos iniciais que ocorrem na interface osso-implante determinam a falha ou o sucesso dos implantes.

A instalação dos implantes deve ser realizada de forma atraumática, sem gerar superaquecimento do tecido ósseo, apresentar estabilidade primária e aguardar um período de três a seis meses para carregar o implante a fim da obtenção de um bom prognóstico[14]. Esta técnica apresenta uma previsibilidade muito grande quanto ao sucesso do tratamento e está embasada por vários trabalhos de pesquisa [30-32].

Existem quatro mecanismos básicos pelos quais os implantes podem ser ancorados no osso: travamento macro e micromecânico, material bioativo, vedamento pelo tecido mole e osseointegração [33]. A falha e consequente perda de um implante podem ser causadas pela técnica cirúrgica deficiente, pela morfologia do implante, pela resposta adversa do paciente ou ainda pela carga clínica excessiva [30].

3.5 Superfícies Modificadas

Entretanto, o tempo elevado de osseointegração do implante para a confecção da prótese levou a pesquisas que propuseram alterações na técnica originalmente apresentada por Branemark e colaboradores quanto a textura de superfície do implante de titânio. O tratamento desta superfície tem por objetivo reduzir o tempo, antecipando a colocação de carga [31,34,35]. Revisando a literatura, observa-se que os implantes com tratamento de superfície apresentam taxa e velocidade de osseointegração maiores quando comparadas com implantes de superfície lisa. [14,31,34,36,37]

O aumento da área de superfície e a qualidade de adesão da interface osso-implante são objetivados pelos processos de modificação de superfícies, sendo muito baseados no princípio de que uma melhor e mais rápida osseointegração pode ser alcançada por meio da alteração topográfica do implante. [2]

Um dos principais objetivos da atual pesquisa em implantes é o desenvolvimento de propriedades que induzam à uma reparação óssea rápida, guiada e controlada. Mais especificamente, além de acelerar o fenômeno de reparação, os implantes deveriam influenciar na formação de uma matriz óssea interfacial, com composição, estrutura e propriedades biomecânicas adequadas e semelhantes àquelas da matriz óssea original. Estas adequações permitiriam não somente a recuperação mais rápida do paciente, mas também a fixação estável entre o osso e o implante, a qual forneceria a possibilidade da aplicação de carga mecânica mastigatória de modo imediato sobre o implante. [2]

Isto induz a um grande diferencial na diminuição do tempo de tratamento, aumento da casuística de sucesso, melhor efeito psicológico no paciente além da diminuição dos custos clínicos. Os diversos processos de modificação de superfície nos implantes de titânio levam a necessidade de se caracterizar estas superfícies, a fim de correlacioná-las às respostas biológicas correspondentes [38,39,40,41]

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. As superfícies rugosas 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 [42].

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 implantes [22]. Estudos recentes têm demonstrado as vantagens das superfícies incorporadas com cálcio, na cicatrização óssea de implantes microestruturados [43].

Em 2000, um estudo avaliou a interação das células sanguíneas e plaquetas com a topografia de dois tipos de superfície: uma rugosa (processo de duplo ataque ácido – (Osseotite - Biomet 3i, Palm Beach Gardens, FL, EUA) e outra usinada. Os resultados mostraram que a superfície rugosa apresentava uma maior interação com as células sanguíneas e plaquetas, quando comparada à superfície usinada, demonstrando a importância das rugosidades nas superfícies dos implantes[44]. Outro estudo[25] também avaliou a interação de plaquetas com a topografia das superfícies e também encontrou uma melhor interação das plaquetas com as superfícies rugosas, quando comparadas às superfícies usinadas. A interação das células sanguíneas e plaquetas com a superfície dos implantes irá determinar todo o processo de osseointegração. [44]

Além de tratamentos de superfície que alteram a sua topografia, existem tratamentos que buscam alterar a energia da superfície dos implantes. Uma

alta energia de superfície proporciona melhor molhabilidade e conseqüentemente melhor adsorção e deposição íons de Ca e P, e moléculas orgânicas como proteínas, lipoproteínas e peptídeos sobre a superfície de TiO₂, potencializando a osseointegração. Estas interações provavelmente ocorrem por forças eletrostáticas entre grupos de aminoácidos com carga positiva e a superfície negativa de TiO₂, ou entre grupos de aminoácidos com cargas negativas através de pontes de Ca⁺⁺ que foram adsorvidas previamente pela superfície negativa de TiO₂. [45]

Através de um processo de jateamento com grânulos de areia e ataque ácido (SLA – Straumann AG, Waldenburg, Suíça), e o enxaguamento da superfície em uma atmosfera de N₂ e contínuo armazenamento em uma solução isotônica de NaCl, conseguiu-se chegar a uma superfície com alto grau de molhabilidade (SLActive – Straumann AG, Waldenburg, Suíça) [45].

A resposta celular, determinada pelo tipo de tratamento de superfície a qual o implante foi submetido, influencia diretamente os estágios da osseointegração. [45]

Através de um estudo em animais, autores avaliaram dois tipos de tratamentos de superfície em relação à aposição óssea durante os estágios iniciais da osseointegração. As superfícies testadas eram tratadas por jateamento por micropartículas (Al₂O₃) mais ataque ácido (SLA), porém uma delas era quimicamente ativada (SLActive). Os resultados demonstraram que o grupo com superfície ativada apresentava uma maior média de contato osso-implante no período de dois e quatro semanas de acompanhamento, porém no período de oito semanas, a média do contato osso-implante não apresentava diferenças estatisticamente significantes. Isto demonstra que a velocidade da formação óssea também é influenciada pelo tipo do tratamento da superfície. [45]

Outro estudo demonstra que o aumento na velocidade da formação óssea pode influenciar diretamente na estabilidade do implante. Os mesmos tipos de superfície foram avaliados (SLA e SLActive) através de uma análise de

frequência de ressonância (RFA – Osstell – IntegrationDiagnostics, Savedalen, Suécia). Os resultados demonstraram que todos os implantes apresentaram sucesso clinicamente, porém foi observado que ocorreu uma mudança da estabilidade primária para a estabilidade secundária após um período de duas semanas para o grupo teste (SLActive) e de quatro semanas para o grupo controle (SLA). Isto demonstra um maior potencial de formação óssea no grupo teste comparada ao grupo controle, concordando assim com o estudo anterior, e demonstra que essa velocidade de formação óssea influencia diretamente na estabilidade do implante [46].

Estudos recentes têm suposto que não só microtopografia, mas também nanotopografia pode influenciar a adesão dos osteoblastos e diferenciação e que a nanoestruturação pode melhorar a diferenciação de células osteoprogenitoras em direção a um fenótipo osteoblástico[47].

Em 2008, um estudo [48] avaliou três tipos de superfície de implantes através de diferentes metodologias (interferômetro, MEV, XPS) e as respostas do tecido ósseo a esses implantes (torque de remoção, avaliação histológica). As superfícies avaliadas sofreram três tipos de tratamento de superfície: jateada por TiO₂; jateada por TiO₂ + tratamento com ácido fluorídrico; e jateada por TiO₂ + modificada por partículas de HA nanométricas. Os resultados demonstraram que o tratamento químico das superfícies produziu uma nanotopografia sobre a microtextura das superfícies jateadas. Análises químicas demonstraram a presença de íons específicos sobre as superfícies modificadas, como íons flúor para os implantes submetidos ao tratamento com ácido fluorídrico e íons de Ca e P para a superfície submetida a partículas de HA. Os resultados dos testes de torque de remoção demonstraram maiores valores de torque para as superfícies modificadas, comparadas à superfície jateada por TiO₂. Isto indica que a nanotopografia associada à deposição de íons específicos sobre a superfície promove uma maior e mais rápida formação óssea, o que pode ser comprovada através dos exames histológicos. [48]

3.5.1 Contato Osso-Implante ou BIC (Bone Interface Contact)

A interface entre o tecido ósseo e a superfície do implante é a área onde a maior parte dos estudos laboratoriais e clínicos na área de Implantodontia estão focados, pois nesta região temos a possibilidade de analisar microscopicamente e celularmente a osseointegração, e também, aferir a quantidade de osso neoformado em contato com o implante ou superfície modificada do implante.

Porém, esta estreita área de contato, denominada "BIC", está entre o tecido ósseo vivo e o implante inserido no organismo. Impossibilitando, quase que totalmente, confecções de amostras em humanos. E sua análise, se torna mais difícil, mesmo em estudos com animais, pela forma de como confeccionar as amostras para visualizar esta região sem perder ou danificar esse contato entre o osso e implante em um tecido vivo junto a um material metálico.

Por isso, a literatura ainda é escassa em resultados de médias ou porcentagens sobre esse parâmetro, principalmente em humanos. E a maioria dos dados existentes são adquiridos após testes destrutivos deste conjunto entre tecido vivo e implantes serem executados.

A osteogênese na interface osso-implante é influenciada por vários mecanismos. Uma série de eventos coordenados, incluindo adsorção de proteínas, proliferação e deposição de tecido ósseo podem ser afetados pelas diferentes topografias de superfície [49]. A rugosidade de superfície apresenta resultados mais rápidos, bem como uma integração óssea mais firme [50], pois promove maior osteocondução aumentando a área de superfície para fixação de fibrina [51], e conseqüentemente conseguindo melhor aposição óssea [52].

Avaliações de implantes comercialmente disponíveis sugerem que os implantes analisados tinham BIC variando entre 31,15% a 87%. Ainda neste estudo, os valores encontrados para as seguintes empresas foram: Straumann (76,5%), 3i (65%), duplo ataque-ácido experimental (44,36%), superfície nanométrica (31,15%) [53].

Outras pesquisas [54] apresentaram um BIC percentual médio de 55% em implantes tratados com duplo ataque-ácido, média esta que pode ser comparada ao estudo em implantes com superfície Osseotite (3i), onde se observou valor de $72.35\% \pm 24.13\%$ para BIC percentual [50].

Comparando com uma superfície hidrófoba, a superfície hidrofílica (SLA modificada) contém menor quantidade de moléculas de carbono e mais de oxigênio, e, assim, estabelece melhores condições biológicas para as células e os tecidos na interface osso-implante [45], proporcionando um provável maior BIC entre o tecido ósseo e implante.

Em busca da superfície de implante ideal, que favoreça a hidrofília e conseqüentemente a osteocondutividade. Karabuda e colaboradores em seu estudo mostraram que as superfícies rugosas promovem a osteocondução aumentando a área de superfície para fixação de fibrina [52]. Quando comparadas a superfícies lisas/usinadas, independente de qual seja o tratamento de superfície, este implante irá obter um contato osso-implante maior [50,55]. Ainda assim, estudos mostram [49] que superfícies de implantes jateadas com partículas cerâmicas influenciam positivamente a resposta precoce do tecido ósseo, e também o BIC, quando comparados a implantes com duplo ataque-ácido [49].

As aplicações da nanotecnologia para a alteração da textura e da química na topografia do implante podem resultar na modulação do comportamento das células, variando as alterações na adesão, a orientação, a mobilidade, e exibição das células pré-osteogênicas e osteogênicas [56]. Isto porque as fibras da matriz extracelular, da membrana basal, os nanoporos comunicantes, e cristais de hidroxiapatita encontrada no osso natural, apresentam dimensões nanométricas[57].

3.6 Métodos para Caracterização

3.6.1 Avaliação por microscopia óptica (MO)

Os métodos de ensino em Biologia Celular e dos Tecidos baseiam-se principalmente no estudo das estruturas e processos celulares sob as microscopias de luz (ML) e eletrônica (ME), permitindo o reconhecimento da célula como um componente dinâmico e participante do metabolismo corporal. Basicamente, estes estudos utilizam como ferramentas, lâminas com colorações histológicas e histoquímicas, para o estudo à microscopia de luz e telas de cobre contrastadas por metais pesados, para o estudo à microscopia elétrica (de transmissão, de varredura, etc.). [58]

Preparações citológicas ou histológicas exigem sistemas de observação adequados, que permitem observar as estruturas. Para essa finalidade o aparelho mais comumente usado é o microscópio óptico que utiliza a luz transmitida ou refletida.

O microscópio óptico (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 [59].

O microscópio óptico de luz transmitida (MOLT) e o microscópio óptico de luz refletida (MOLR) são os mais comumente usados. Estes dois tipos são similares no que se refere ao sistema de lentes, polarizador, analisador e quanto aos vários diafragmas empregados, porém diferem quanto ao sistema de iluminação: o MOLT utiliza uma fonte abaixo da amostra e o MOLR usa a fonte acima da amostra. [58]

As análises exigem preparação especial das amostras, em secções delgadas (luz transmitida), polidas (luz refletida), ou delgadas polidas (ambas).

É possível analisar fragmentos de rochas ou montagens de material particulado, embutido em resinas (geralmente epóxi, acrílica ou poliéster). [58]

3.6.2 Preparação Histológica:

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. [60]

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. [60]

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 [60].

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 [60].

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. [60]

O azul de tolúina 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 [60].

Como o tecido ósseo é um tecido muito duro devido à mineralização de sua matriz, dois métodos são empregados para prepará-lo para estudo. Sua dureza e força são causadas pela associação dos cristais de hidroxapatita com o colágeno. Quando um osso é descalcificado (todo mineral é removido do osso), ele ainda mantém sua forma original, mas se torna tão flexível que pode ser dobrado como um pedaço de borracha dura. Se o componente orgânico é extraído do osso, o esqueleto mineralizado ainda mantém sua forma original, mas se torna extremamente quebradiço e pode ser fraturado com facilidade [61].

Cortes descalcificados podem ser preparados pela descalcificação de um osso em solução ácida para remover os sais de cálcio da matriz. O tecido pode, em seguida, ser incluído, seccionado e corado rotineiramente para estudo. Cortes por desgaste são preparados serrando o osso em fatias finas, seguindo pela raspagem progressiva destes cortes com abrasivos entre placas

de vidro. O corte é montado quando está suficientemente delgado para estudo ao microscópio óptico [61].

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho utilizou amostras confeccionadas a partir de um trabalho prévio intitulado *"Análise Comparativa Do Efeito De Diferentes Superfícies Sobre A Resposta Tecidual Perimplantar Em Regiões Com Baixa Densidade Óssea: Modelo Animal Coelho"*, da autora Letícia Kirst Post, no ano de 2009 [62], tese de doutorado sob orientação do professor Roberto Hübler e da professora Marília Gerhardt de Oliveira.

4.1 Considerações Éticas

O projeto desta pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob protocolo de nº. 08/00020 (Anexo A). Neste trabalho foram observadas as Normas para a Prática Didático científica da Vivisseção em Animais, que consta na Lei 6.638 de Março de 1979, respeitando-se também os Princípios Éticos na Pesquisa Experimental, determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Anexo B).

4.2 Confeccãoe Caracterização dos Implantes

A confecção e a caracterização dos implantes, como também os ensaios para adequação às normas técnicas foram realizados e são de responsabilidade do Laboratório de Materiais e Nanociências – Grupo de Estudos de Propriedades de Superfícies e Interfaces do Centro de P&D em Física da Faculdade de Física da PUCRS. Para o presente estudo foram produzidos oito implantes cilíndricos, feitos de titânio comercialmente puro (Baumer S. A, de São Paulo, Brasil), conforme descrito pela norma NBR-ISO

5832-2, que foram revestidos com camada porosa de titânio mais tratamento com ataque de um ácido desenvolvido no GEPSI-LMN. Detalhes do implante e da microestrutura superficial dos mesmos podem ser observados na figura 4.1.

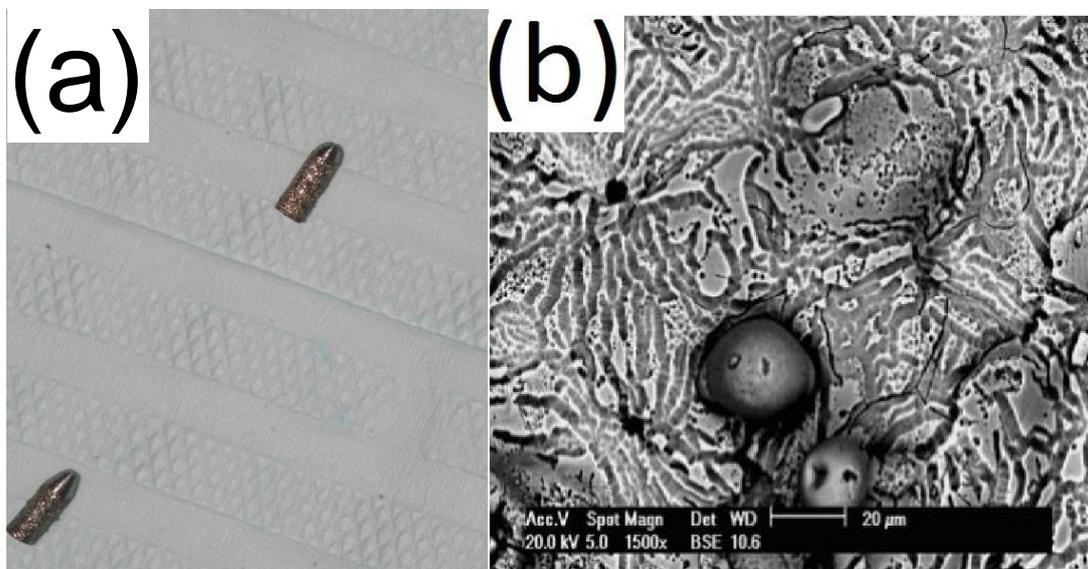


Figura4.1 - a) Fotografia do implante PSA-nano pronto para embalagem e (b) micrografia da superfície mostrando os microcanais e as nanotexturas em seu interior.

4.3 Modelo Animal

O modelo animal usado para o estudo foi o coelho da raça Nova Zelândia, espécie *Oryctolagoscuniculus*, da ordem Lagomorpha, gênero *Oryctolagos*. Os animais selecionados foram obtidos e mantidos, até o final do experimento, junto ao Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPeI). Os procedimentos de manipulação e alimentação foram realizados, seguindo a rotina do Biotério. Durante todo o experimento, os animais permaneceram em alojamento com temperatura, umidade e iluminação controladas, e em gaiolas padrão, devidamente identificadas. [62]

4.4 Procedimento Cirúrgico

Para a realização da pesquisa foram obedecidos os princípios de biossegurança e controle de infecção. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Hospital Veterinário da UFPel. As cirurgias ocorreram de forma independente, sobre uma bancada protegida por um campo de mesa estéril descartável e trocado, juntamente com os materiais e instrumentais cirúrgicos, a cada animal. Na sala de pré-anestesia, após a aferição do peso, os animais foram anestesiados com Zoletil® 50mg de peso, na dose de 5mg/kg e de Xilazina®, 3mg/kg ministradas nesta sequência, por via intraperitoneal.

Foi realizada a incisão da pele, com lâmina de bisturi nº 15, e em seguida do periósteo. A exposição do tecido ósseo subjacente (face medial da tíbia) foi realizada com descolamento do periósteo através de descolador de Molt, o qual auxiliou, também, no afastamento e na manutenção do guia cirúrgico em posição

Com a região óssea exposta e o guia cirúrgico em posição, iniciou-se a preparação da loja óssea, com o escalonamento gradual das brocas, numa sequência lógica pré-estabelecida, na velocidade de 800 rotações por minuto e torque de 30 newtons-metro. Utilizou-se um motor para implantes (Driller BLM 600 PLUS) e um contra-ângulo (Anthogyr) o qual tinha redução de 16 para 1 rpm. Todas as perfurações contavam com abundante irrigação externa com soro fisiológico.

No período pós-operatório, os espécimes permaneceram no biotério da UFPel, sob cuidados dos pesquisadores e orientação de médicos-veterinários. A morte dos animais ocorreu após um período de 30 dias da colocação dos implantes. O procedimento foi realizado nas instalações do biotério da UFPel por meio da técnica de overdose anestésica, correspondendo a 5 vezes a dose terapêutica, ocasionando o óbito por parada cardiorrespiratória. Após a constatação da morte dos animais, pelos sinais vitais, os locais das

implantações foram acessados com uso de bisturi e lâmina 11, expondo toda a tíbia. Para maiores detalhamentos cirúrgicos, avaliar referência [62].

Além das tíbias dos coelhos, também foram reservadas as mandíbulas direitas às quais foram seccionadas nas extremidades distais e mesiais e depois seccionadas transversalmente conforme linha pontilhada mostrada na Figura 4.2.

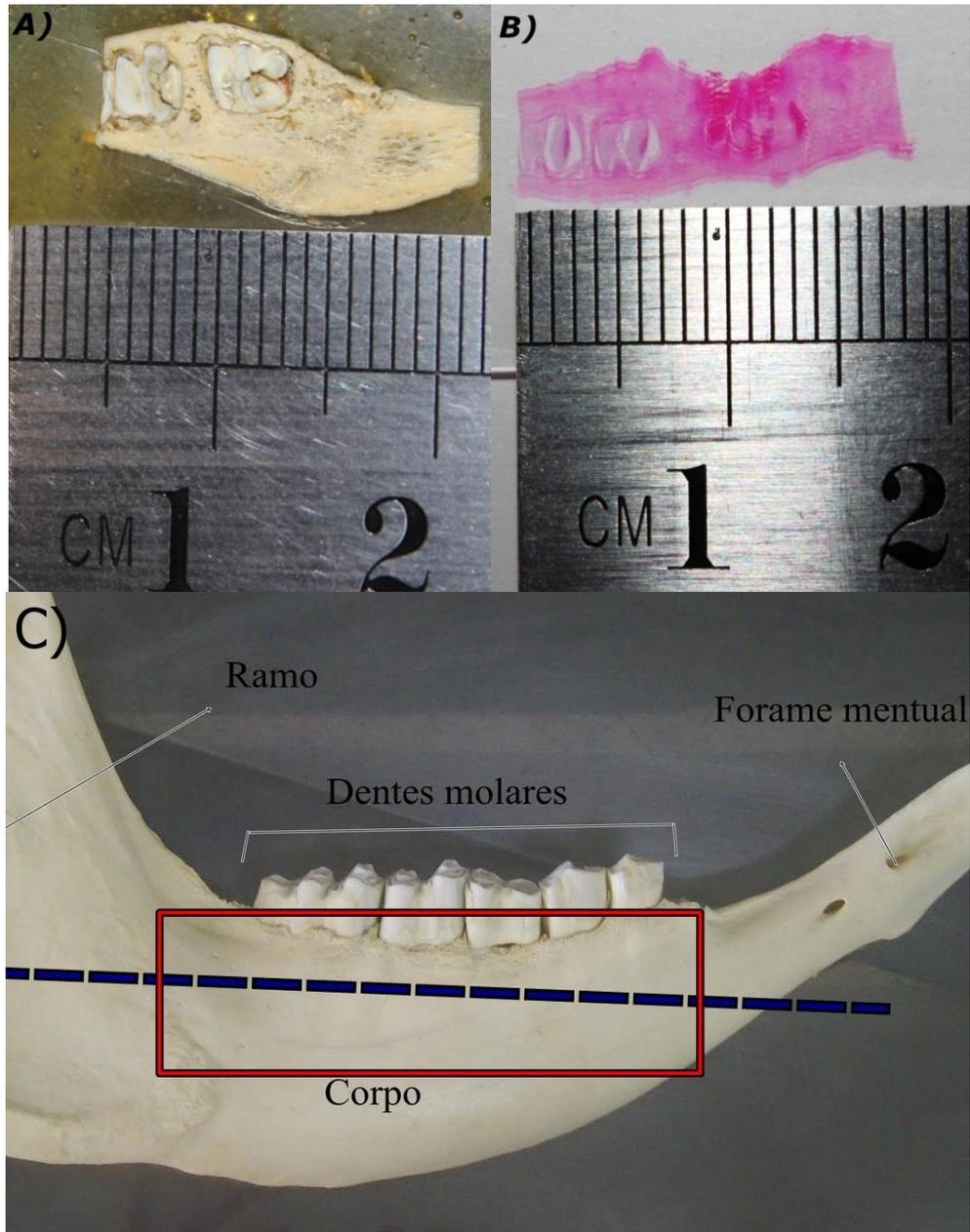
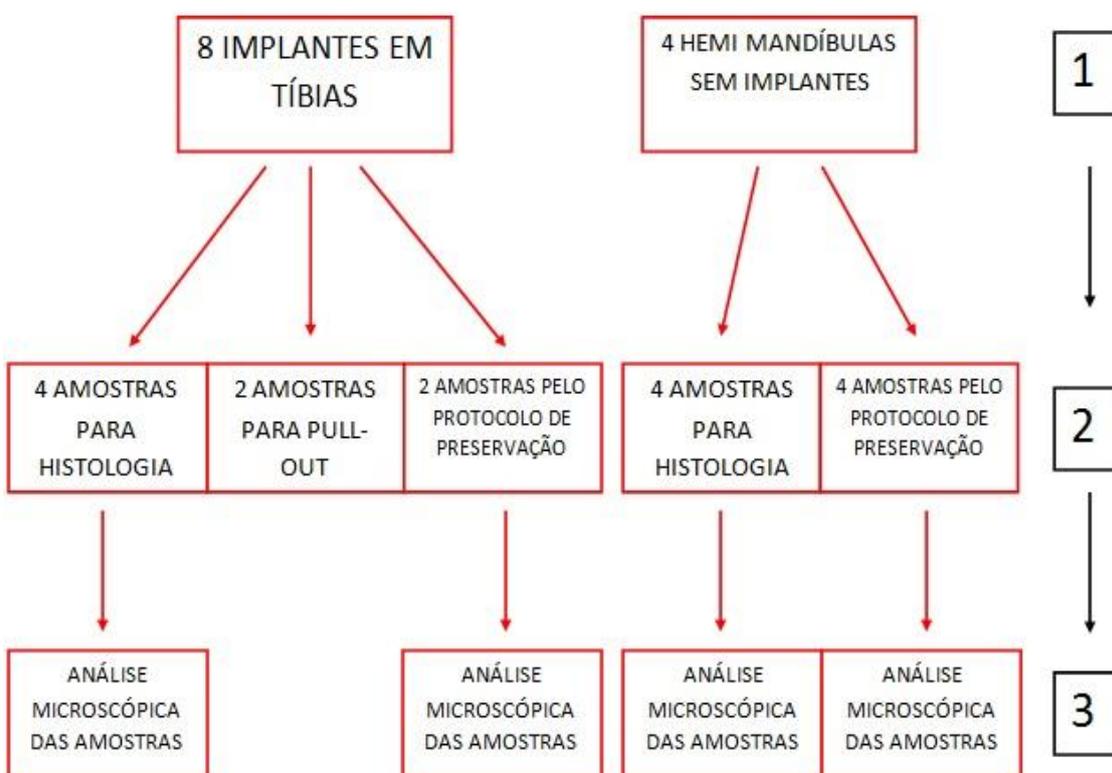


Figura 4.2 (A) - Fragmento superior da mandíbula seccionada confeccionado pelo protocolo de preservação óssea;(B) - Fragmento inferior usado para confecção de lâmina histológica e (C) - Esquema do corte das regiões da mandíbula utilizadas neste trabalho.

4.5 Fluxograma da Metodologia

Fluxograma da metodologia mostrando a sequência da amostragem do presente estudo (quadrados e setas vermelhas), a partir da confecção das amostras conforme respectivas áreas doadoras para amostragem (1), a divisão e técnica de preparação utilizada para cada amostragem (2) e por fim, a devida análise para cada amostragem (3).



4.6 Preparação das Amostras para Observação Microscópica e Histológica

As mandíbulas seccionadas foram escolhidas para confecção de amostras onde o tecido ósseo não foi agredido cirurgicamente.

Conforme Figura 4.2- C, a área escolhida para análise foi a região dos dentes, sendo que os quatro fragmentos superiores foram usados para confecção do protocolo de preservação óssea e os quatro inferiores para confecção de lâminas por coloração HE, conforme visualizado na figura 4.2 A e B, respectivamente.

Das oito amostras com implantes, quatro foram selecionados para histologia, duas para confecção do protocolo de preservação óssea, duas para testes de pull-out, onde foi testada a força da osseointegração adquirida nestes implantes.

4.6.1 Preparação pelo protocolo de preservação óssea

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%).

Após a liofilização as amostras foram embutidas em resina acrílica a vácuo para possibilitar o corte das regiões de interesse nas mandíbulas e nas tíbias, os cortes foram feitos nas extremidades distal e mesial da tíbia e após isso, seccionados bem próximos de cada implante. O lixamento foi realizado de forma manual com uma sequência de lixas de gramatura desde 100 até 4000, fixas em bloco de vidro e sob irrigação com água corrente, e posteriormente, foi realizado o polimento em uma politrizmetalográfica da marca Struers usando pastas de diamante de 9 μm , 1 μm e 0,25 μm em sequência e com irrigação constante com uma mistura de álcool isopropílico/propilenoglicol na proporção de 1:1. Após cada etapa de preparo, antes da troca de lixa e granulação ou de

pastas de polimento diamantadas, as amostras foram observadas em microscópio óptico para conferir a correta planicidade. O objetivo deste preparo foi a obtenção de uma superfície polida no sítio do implante e nas suas adjacências, assim como do tecido ósseo na mandíbula, mantendo as características da parte mineral e do implante para posterior observação microscópica.

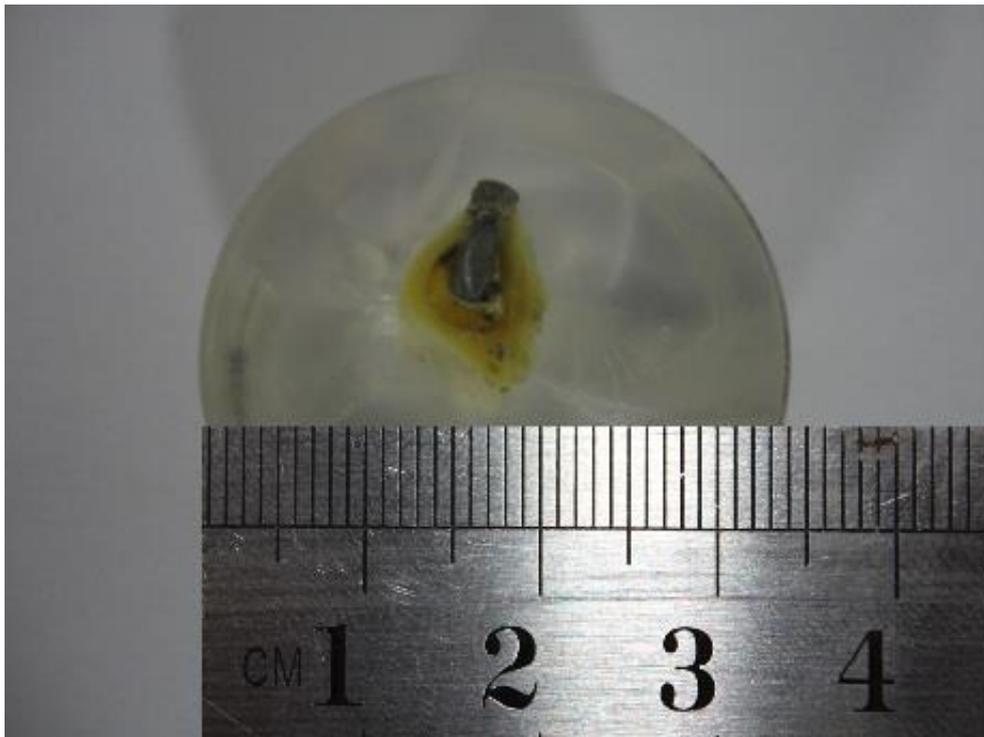


Figura 4.3 - Amostra confeccionada pelo protocolo de preservação.

4.6.2 Preparação pelo método de Coloração HE

As quatro secções mandibulares inferiores foram preparadas conforme a técnica histológica de coloração por HE descrita.

Após 24 horas de fixação em formalina tamponada 10% (pH 7,0), os espécimes foram descalcificados em solução de ácido fórmico a 20% sob agitação e temperatura ambiente, desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Os espécimes foram identificados e submetidos ao corte de 6 μ m em micrótomo para receber à técnica histoquímica de coloração hematoxilina-eosina (HE) da seguinte forma: dois banhos de xilol; hidratação em álcool

(absoluto e 96°GL); lavagem em água corrente; coloração com hematoxilina (oito minutos) e coloração com eosina (dois minutos). Após a coloração, as amostras foram lavadas, desidratadas em álcool e receberam novo banho de xilol para a montagem das lâminas com lamínula e Entellan®.

As amostras com implantes, passaram pela mesma técnica histológica de coloração por HE, após terem sido removidos os implantes das amostras com o máximo cuidado e irrigação constante com um aparelho de ultrassom.

4.7 Análises pelo Protocolo de Preservação e pela Técnica Histológica

A microestrutura dos implantes e a qualidade do osso neoformado foram avaliadas por microscopia óptica (MO). A análise qualitativa do tecido ósseo periimplantar foi obtida por MO Olympus BX-60 com câmera de 14 Mega pixels.

4.7.1 Análises das Amostras Sem Implantes

As quatro lâminas histológicas e as quatro amostras pelo protocolo de preservação óssea confeccionadas para essa amostragem foram analisadas por microscopia óptica de transmissão e de reflexão, respectivamente, com o aparelho Olympus BX-60 (Olympus Co, Japão) em magnificações de 50x e 100x. Nesta etapa, foram obtidas imagens microscópicas digitalizadas, com câmera digital de 14mpixéis, que foram analisadas, em um software denominado ImageJ, onde foi possível a descrição qualitativa do tecido ósseo pela técnica de histologia em lâminas por coloração Hematoxilina-Eosina e a descrição qualitativa do tecido ósseo pelo protocolo de preservação óssea.

Após isso, foi feita uma comparação entre as descrições obtidas dos tecidos ósseos nas técnicas, onde foram avaliadas suas vantagens e desvantagens.

4.7.2 Análises das Amostras com Implantes

As duas secções confeccionadas pelo protocolo de preservação óssea foram analisadas, primeiramente, por microscopia óptica, com o aparelho Olympus BX-60 (Olympus Co, Japão) em magnificações de 50x,100x. Nesta etapa foram obtidas imagens digitalizadas, com câmera de 14mega pixies, que foram analisadas em um software denominado ImageJ,onde foi possível a descrição qualitativa do tecido ósseo adjacente ao implante e microestruturas dos implantes.

A seguir, as duas amostras foram submetidas à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), da marca Philips, modelo XL 30, em magnificações de 50x, 100x, 200x e 400 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.

Após isso, foi feita uma comparação entre as descrições obtidas dos tecidos ósseos nas técnicas, onde foram avaliadas suas vantagens e desvantagens.

5 RESULTADOS

Como foi descrito na metodologia do trabalho, a amostragem foi dividida em dois grupos diferentes para análise, pela diferença da região óssea (tíbias e mandíbulas) e pela utilização de implantes ou não no tecido ósseo.

Os resultados das análises qualitativas foram realizados de forma dividida assim como a amostragem, para se poder comparar o tecido ósseo sem implantes pelas duas técnicas propostas (histológica e protocolo de preservação óssea) e o tecido ósseo com implantes da mesma forma. Com isso, os resultados serão apresentados em duas etapas – avaliação do tecido ósseo sem implantes pelas duas técnicas (amostragem de tecido ósseo da mandíbula), avaliação do tecido ósseo com implantes pelas duas técnicas (amostragem de tecido ósseo da tíbia).

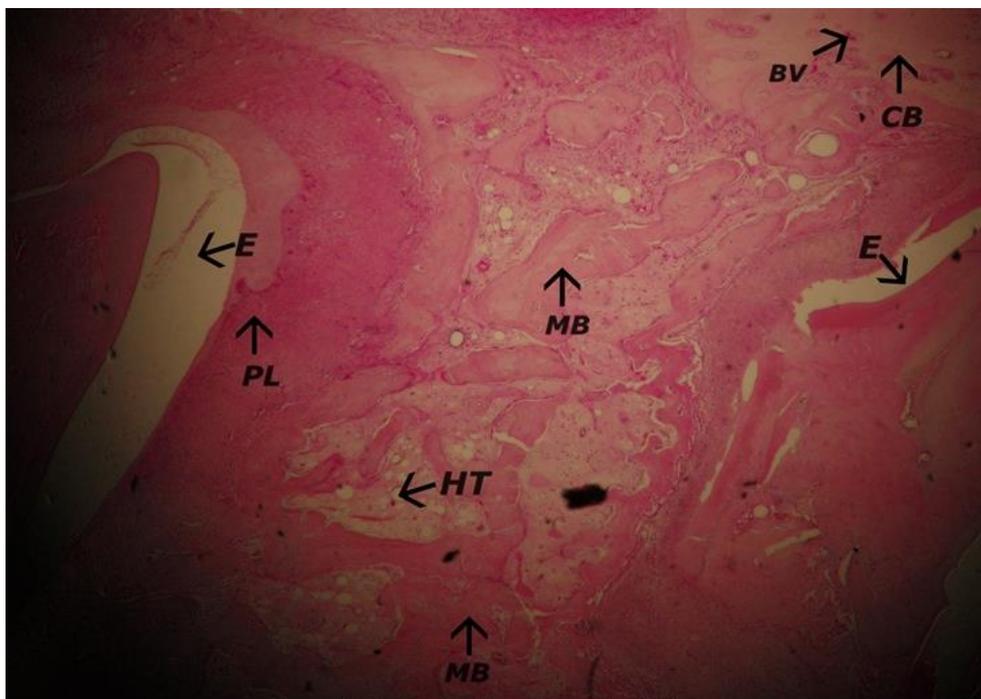
5.1 Avaliação e comparação da amostragem sem implantes (tecido ósseo da mandíbula) pelas duas técnicas propostas

A principal técnica de coloração de tecidos para o estudo de Histologia básica é a técnica HE (Hematoxilina-Eosina). Através dessa técnica são diferenciadas porções basófilas e acidófilas do tecido estudado. A hematoxilina é basófila, ou seja, tem afinidade por substâncias básicas. A eosina é acidófila, tendo afinidade pelo citoplasma, fibras colágenas e outras substâncias ácidas das células. Essa técnica nos mostra principalmente características orgânicas do tecido estudado. [61]

A análise histológica das amostras com tecido ósseo sem implantes, em magnificações de 50x e 100x em microscópio óptico de transmissão, permitiu

uma exímia análise qualitativa do tecido. Foram averiguadas diversas características ósseas como:

- Visualização de grande quantidade de tecido ósseo secundário ou maduro, osso mais calcificado e mais denso do que o osso primário;
- Diferenciação indireta de áreas de tecido ósseo compacto e esponjoso;
- Visualização de canais de Harvers;
- Regiões de vascularização óssea, bem como, vasos sanguíneos e suas células, tecido hematopoiético, ligamento periodontal e suas células, colágeno;
- Osteócitos maduros e células características de tecido ósseo como osteoblastos, osteoclastos e células osteoprogenitoras em determinadas regiões de reabsorção e formação óssea;
- Rica avaliação celular e orgânica do tecido;



MO Transmissão - Aumento 50X

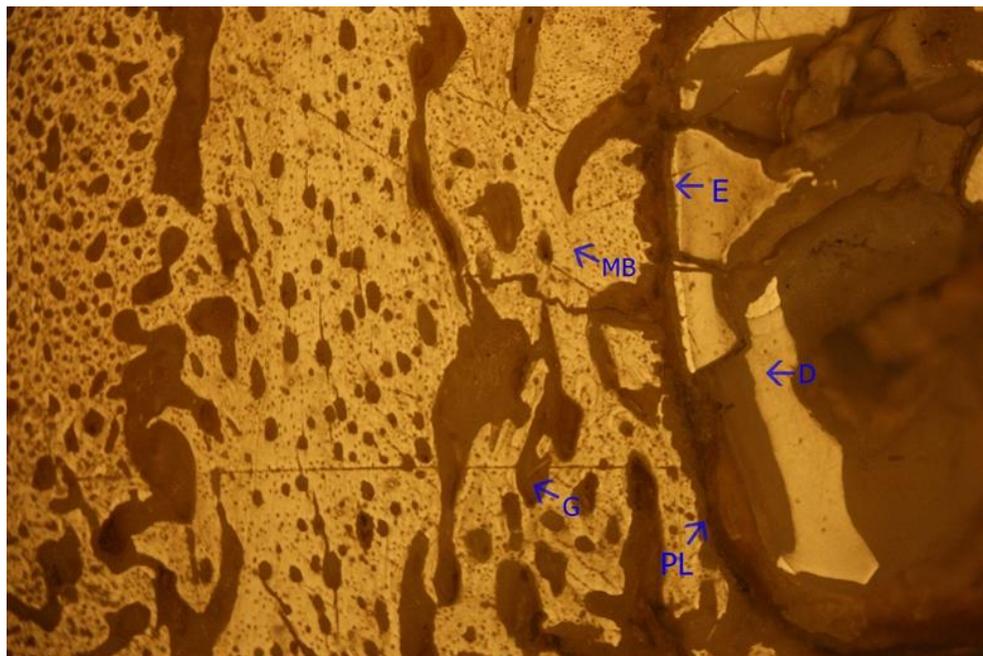
Figura 5.1- Tecido ósseo sem implantes, técnica histológica. Legendas: E= Esmalte, D= Dentina, MB= Osso Esponjoso, CB= Osso Cortical, BV= Vaso sanguíneo, HT= Tecido Hematopoiético e PL= Ligamento Periodontal.

Já a análise do tecido ósseo pelo protocolo de preservação óssea proposto no estudo proporcionou a visualização de características inorgânicas deste tecido, sem possibilidade da análise de características orgânicas diretamente, como pode ser visualizado nas figuras 5.2, 5.3 - B e 5.4 - A.

Porém, o conjunto das informações inorgânicas adquiridas nas amostras permitem avaliações qualitativas indiretamente do tecido. Assim como, o conjunto de informações orgânicas nas amostras pela técnica histológica também permitiu avaliações qualitativas indiretas, conforme as figuras 5.1, 5.3-A e 5.4 - B.

A análise do protocolo de preservação óssea, em ampliações de 50x e 100x em microscópio óptico de reflexão, permitiu a análise de características ósseas como:

- Visualização de grande quantidade de tecido ósseo secundário ou maduro, osso mais calcificado e mais denso do que o osso primário;
- Diferenciação de tecido ósseo compacto e esponjoso;
- Visualização de canais de Harvers;
- Visualização de toda região mineral tanto do tecido ósseo como dentário bem delimitado;
- Visualização indireta de regiões onde se encontravam tecidos orgânicos, bem como áreas de ligamentos periodontais, “gaps” onde haviam áreas de vascularização dentro do tecido mineral;
- Rica avaliação do tecido inorgânico em qualidade e delimitações;



MO Reflexão - Aumento 50x

Figura 5.2 - Tecido ósseo sem implantes, pela técnica de preservação óssea.

Legendas: E= Esmalte, D= Dentina, MB= Osso Medular, G= Gaps ósseos e PL= Ligamento Periodontal.

Os registros das imagens para a comparação entre os métodos de análise focaram regiões ósseas semelhantes nas amostras realizadas pelas duas técnicas diferentes, com o intuito de mostrar as características reveladas por cada protocolo e suas vantagens e desvantagens na apresentação do tecido ósseo.

A figura 5.3 expõe uma mesma região do tecido ósseo pelas duas técnicas de confecção de amostras, juntamente com uma análise por microscopia óptica. A imagem permitiu a comparação de características mostradas em cada técnica, onde pode-se verificar a maior quantidade de informações visualizadas pela técnica histológica como: características celulares tanto ósseas como de vascularização e de ligamento periodontal, tecido orgânicos de diferentes tipos e qualidade e quantidade óssea na região (figura 5.3-A). Enquanto algumas informações semelhantes como: quantidade e qualidade óssea, regiões de áreas de vascularização mostradas indiretamente pelos “gaps” no meio do tecido mineral, regiões onde o ligamento periodontal se posicionava e tecido dentário bem definido (esmalte e dentina), foram passíveis de análise pelo protocolo de preservação óssea (figura 5.3 – B).

Algumas áreas inorgânicas tiveram uma definição melhor, como o esmalte dentário, pelo "protocolo de preservação".

A riqueza de detalhes orgânicos e celulares pode ser analisada pela técnica histológica, no entanto a qualidade e compactação óssea do tecido ósseo e dentário foi mais facilmente analisada pelo protocolo de preservação óssea por seu foco unicamente na parte mineral.

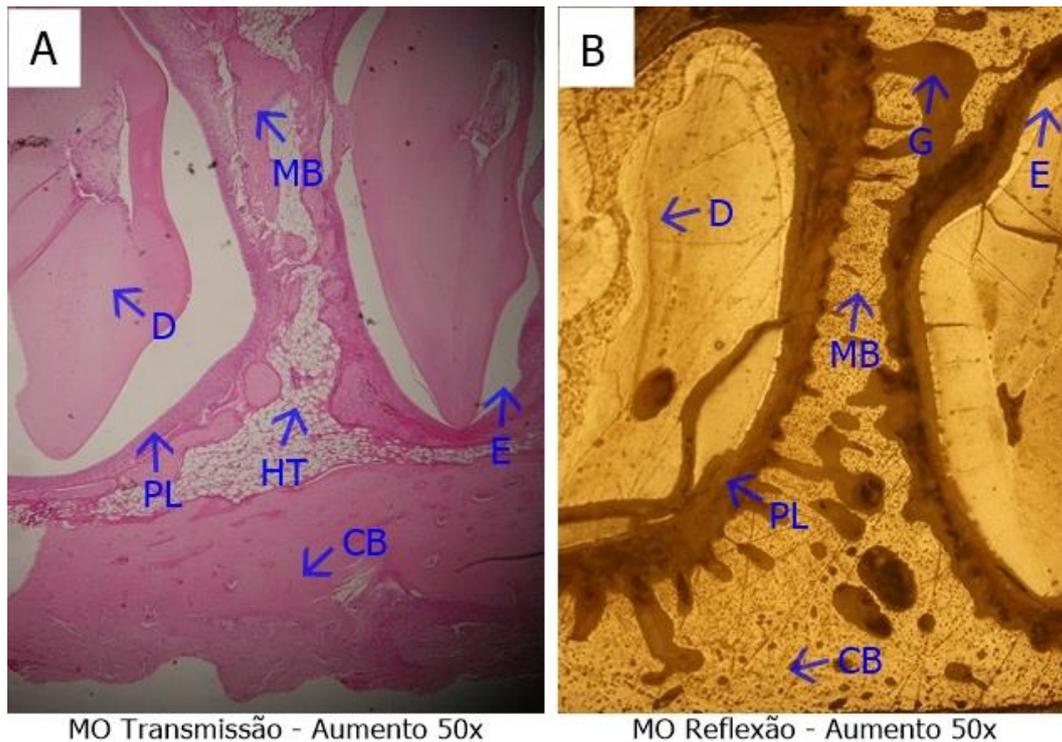
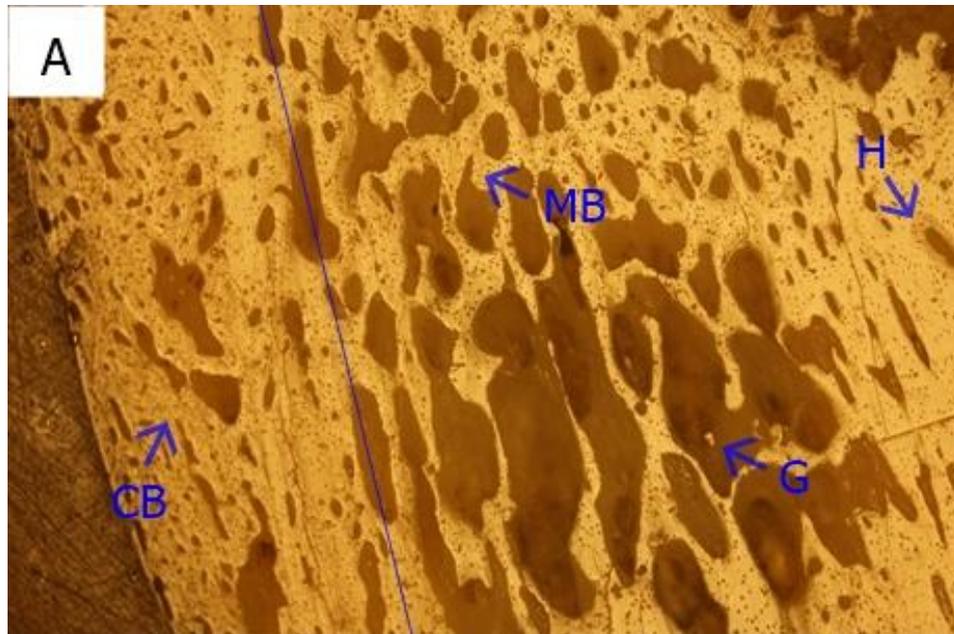


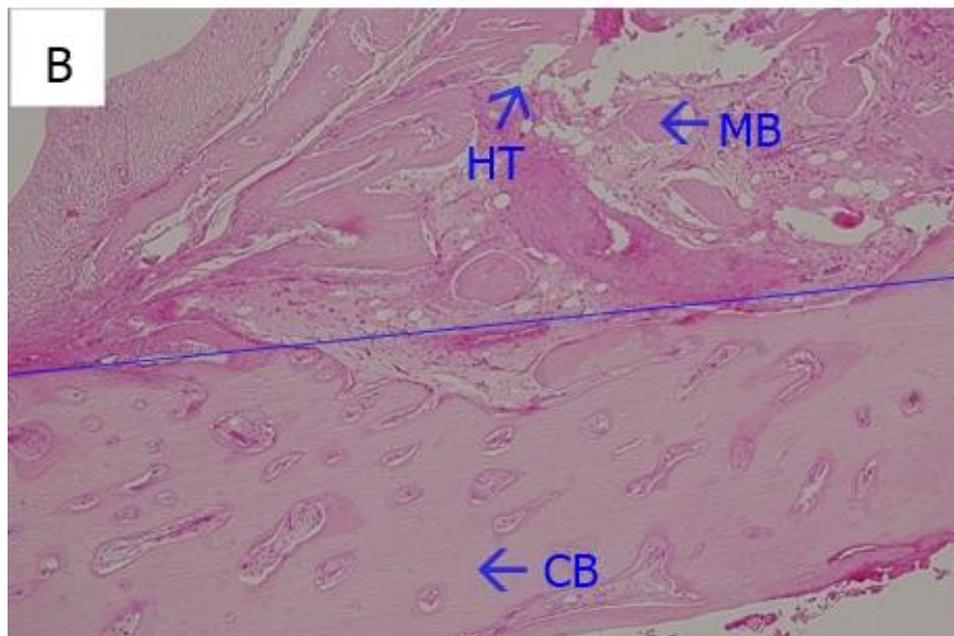
Figura 5.3 - A e B: Região semelhante de tecido ósseo mandibular mostrada por técnicas diferentes (protocolo de preservação[B] e técnica histológica [A]) - Legendas: G= "gaps", MB= osso esponjoso, CB = osso cortical, E= Esmalte, D= Dentina, PL = Ligamento Periodontal, HT= Tecido Hematopoiético

A figura 5.4 mostra regiões semelhantes do osso mandibular mais específicas, as quais proporcionaram a análise mais crítica do osso pelas duas técnicas. Nela se conseguiu delimitar muito bem áreas de tecido ósseo compacto e esponjoso pelas duas técnicas e também permitiu a visualização de canais de Havers pelas duas técnicas. Esta imagem exemplificou a possibilidade de avaliação do tecido mineral ósseo de forma semelhante pelas

duas técnicas apresentadas e ainda com uma análise mais abrangente, uma avaliação indireta superficial de regiões onde se encontravam tecidos de vascularização, ligamentais e espaços celulares pelo protocolo de preservação.



MO Reflexão - Aumento 100x



MO Transmissão - Aumento 100x

Figura 5.4 - A e B: Região semelhante do tecido ósseo mandibular mostrada por técnicas diferentes (protocolo de preservação [A] e técnica histológica [B]) - Legendas: MB= osso esponjoso, CB = osso cortical, HT= Tecido Hematopoiético, G= "gaps", H= Canais de Havers

A avaliação de diferentes regiões das amostras nas duas técnicas propostas mostrou que a análise histológica do tecido ósseo mandibular sem implantes foi substancialmente mais rica em informações do que o protocolo de preservação óssea. Com a comparação das amostras pelas duas técnicas em diferentes regiões do tecido ósseo mandibular, exemplificado pelas Figuras 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4, se verificou uma análise mais abrangente pela técnica histológica quando o tecido ósseo está sem implantes.

Porém o "protocolo de preservação" não se difere tanto quando avaliada a parte mineral do tecido ósseo e dentes, mostrando ser uma técnica apta à análise de tecidos ósseos.

5.2 Avaliação e comparação da amostragem com implantes (tecido ósseo da tíbia) pelas duas técnicas propostas

A confecção das lâminas histológicas exige algumas etapas pelas quais o metal (titânio) que está aderido ao osso nas amostras não pode reagir, pois irá prejudicar ou até condenar o resultado final da lâmina, como a descalcificação pelo uso de ácidos ou o desgaste do tecido ósseo junto ao implante sem devidos cuidados, podendo impregnar o tecido ósseo com metais ou superaquecê-lo[61].

As amostras que foram avaliadas pela técnica histológica passaram por um preparo onde os implantes de titânio foram removidos de forma cuidadosa, utilizando um ultrassom odontológico e irrigação abundante. Para na confecção da lâmina histológica apresentar somente o tecido ósseo sem metal e passar pelo protocolo padrão de preparo histológico.

Os resultados comparativos de análise do tecido ósseo com implantes pelas duas técnicas mostraram uma vantagem significativa de características ósseas e implantares pelo método de "preservação óssea" em relação ao método histológico.

A remoção do implante de titânio para confecção da lâmina histológica pelo protocolo padrão, fez com que a análise crítica das regiões de contato

entre osso-implante fossem perdidas, pois este osso em contato, em determinadas áreas continuou aderido ao implante, como pode ser visto na figura 5.5. Com isso, não se teve condições de avaliação do BIC, resultando em uma grande perda da qualidade de avaliação de regiões de neoformação óssea e nenhuma possibilidade de avaliação do implante de titânio pela técnica histológica.

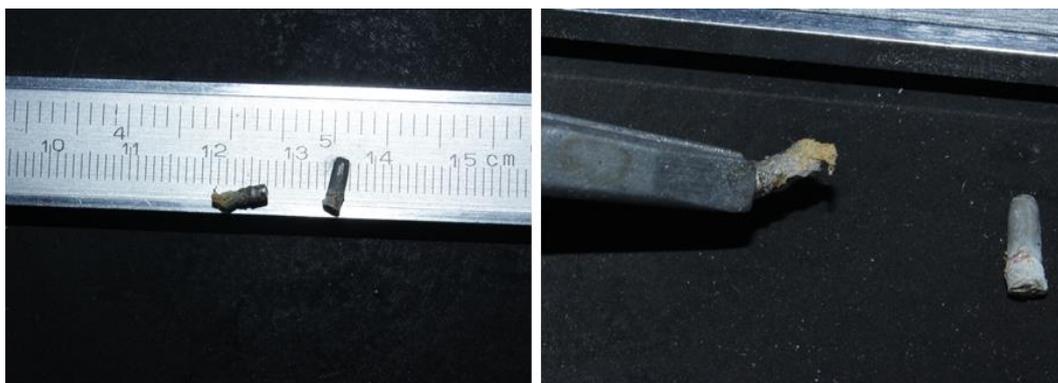


Figura 5.5 - Osso aderido a superfície do implante após remoção com uso de ultrassom.

Por outro lado, as amostras preparadas pelo "protocolo de preservação óssea" mantiveram o implante em total estabilidade no local de osseointegração e não geraram danos ao tecido ósseo periimplantar, permitindo avaliações de todas regiões de contato entre o tecido ósseo e a superfície do implante de titânio, mostrando as regiões de neoformação óssea ao redor do implante de titânio e permitindo análises da própria superfície porosa do implante, em maiores aumentos no microscópio, conforme Figura 5.7.

A figura 5.6 apresenta uma comparação das análises feitas pelos dois protocolos estudados neste trabalho. Pode ser verificado na Figura 5.6 - A, para a amostra preparada pelo protocolo de preservação óssea, a qualidade óssea ao redor do implante, com excelente delimitação, permitindo avaliação do tecido ósseo periimplantar e análise do implante de titânio e sua superfície, enquanto a Figura 5.6 - B, preparada pela técnica histológica, mostra a delimitação de onde se encontrava o implante, indicando a grande perda de tecido ósseo que ocorreu na retirada do implante osseointegrado.

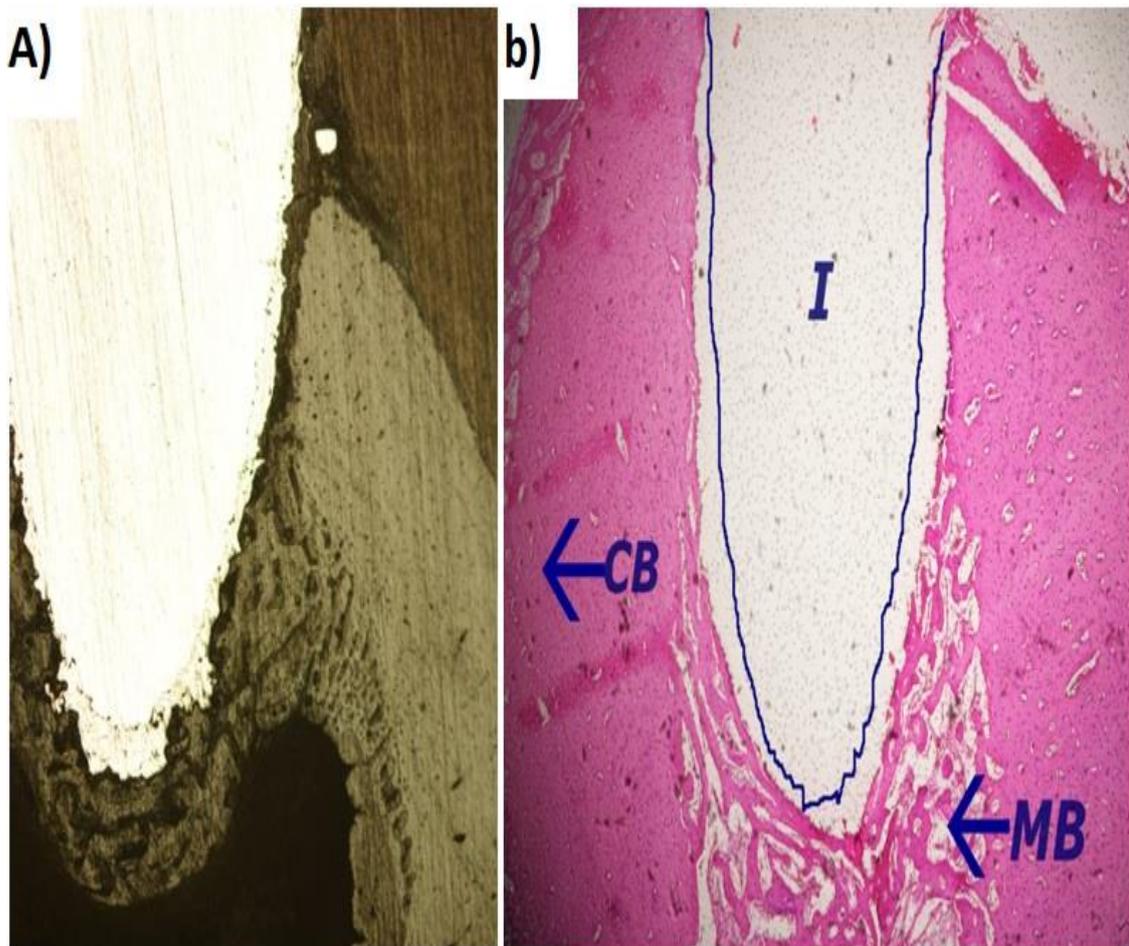


Figura 5.6 – A e B – Imagem comparativa entre tecido ósseo com região de implante confeccionado pelo protocolo de preservação óssea (A) e tecido ósseo com região de implante confeccionado por técnica histológica.

A análise de tecido ósseo distante ao implante permitiu as mesmas comparações feitas conforme a amostragem avaliada neste capítulo no tópico 5.1, com características e qualidade de visualização do tecido celular e ósseo mais abrangente na técnica histológica enquanto o "protocolo de preservação óssea" permite em grande parte apenas avaliações minerais do tecido ósseo.

O "protocolo de preservação óssea" se mostrou significativamente mais vantajoso sobre a técnica histológica quando comparado em tecido ósseo com implantes pela sua excelente qualidade de avaliação em características importantes de osseointegração como: a análise do contato osso-implante (BIC), análise de regiões de neoformação óssea e avaliação da superfície do

implante de titânio, conforme Figura 5.7, enquanto a técnica histológica não permitiu quase nenhum destes detalhes.

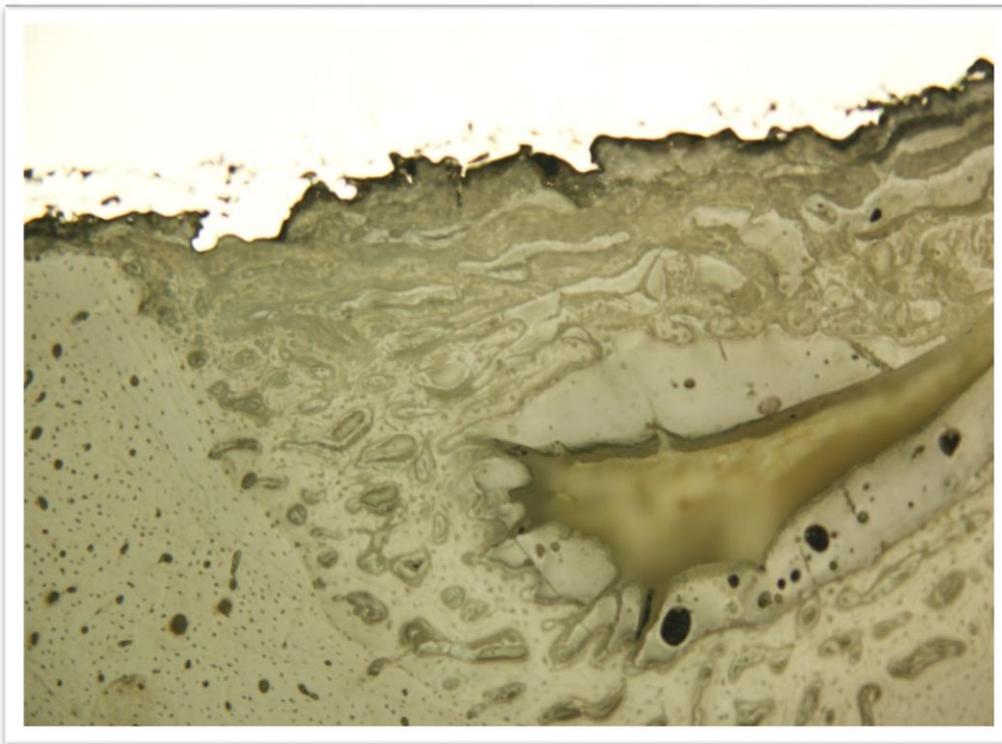


Figura 5.7 - Região de detalhe do contato osso-implante pelo protocolo de preservação óssea.

6 DISCUSSÃO

Nas análises sem implantes apresentadas neste estudo as características ósseas orgânicas mostradas pela técnica histológica permitiram uma avaliação profunda do tecido ósseo quanto a: quantificação celular, análise de células básicas do tecido ósseo, análise de vascularização do tecido ósseo, análise de áreas presentes com osteoclastos e osteoblastos, mostrando reabsorção óssea e remodelação óssea respectivamente, osso cortical ou medular, entre outras análises que não foram o foco da avaliação deste estudo

Entretanto, o "protocolo de preservação óssea" não se diferiu tanto da análise histológica quanto a avaliação da parte de tecido ósseo mineral exclusivamente, pois pode-se avaliar com facilidade áreas de osso cortical e osso medular e compactação óssea com excelente qualidade. Nas regiões escuras onde o tecido orgânico se perdeu pela confecção do método, pode-se avaliar indiretamente áreas de vascularização como "gaps" no tecido ósseo, regiões de ligamento periodontal, entre outras áreas de tecido orgânico e diretamente canais de Havers.

Segundo Gartner, L.P e colaboradores [61], os métodos de análise histológica de tecido ósseo e tecido dentário visam avaliação da parte orgânica e inorgânica do tecido pelo uso de diferentes técnicas. Esta constatação está relacionada com os bons resultados achados na avaliação histológica no presente estudo, pela técnica de lâminas por coloração HE, na qual o tecido ósseo é analisado sem implantes possibilitando uma rica avaliação celular dos tecidos.

Porém alguns autores descrevem alguns danos ao tecido presente nas amostras confeccionadas pela técnica histológica, como no trabalho de Piatelli e colaboradores[63] os quais mostraram a necessidade de desidratação prévia

do tecido ósseo e desgaste para confecção de lâminas histológicas. Durante esta preparação histológica, o tecido ósseo sofre alterações relacionadas à técnica de processamento; a fixação do material em formol causa um espaço perilacunar, resultante da contração do osteócito. Já Marotti e colaboradores[64], disseram que a fixação do tecido ósseo não interfere substancialmente na preservação dos osteócitos; o processo de desmineralização também causa retração das células ósseas, mas este fenômeno pode ser minimizado pelo uso de descalcificadores menos agressivos.

Aprofundando-se mais no estudo dos métodos empregados para estudo histológicos de tecido ósseo verificam-se duas técnicas principais e as duas possuem alguma desvantagem que são: cortes descalcificados e cortes por desgaste, nos cortes descalcificados, os osteócitos são distorcidos pelo banho no ácido descalcificador; nos cortes por desgaste, as células são destruídas, e as lacunas e canalículos ficam preenchidos com restos de osso. [61]

Esses dados mostram a dificuldade de se manter todas as características ósseas quando confeccionada uma amostra de tecido ósseo para análise em lâminas. Porém, nos resultados apresentados do presente estudo, estes danos ou desvantagens não foram prejudiciais na avaliação de características ósseas mais superficiais do tecido.

O uso do "protocolo de preservação óssea" apresentado mostrou que para uma avaliação de características ósseas como: compactação óssea, qualidade óssea ou defeitos ósseos, se tem maior qualidade de análise e menor chances de defeitos na confecção de amostras, em relação a confecção das lâminas histológicas.

Nas análises das amostras com implantes do presente estudo, o protocolo proposto no trabalho teve resultados muito superiores contra a análise histológica. A confecção das amostras para análise da osseointegração, proposta até então, não segue um padrão universal. Existem dificuldades de confecção de uma amostra de tecido ósseo com implantes e necessidade de cuidados e equipamentos precisos para não danificar as

amostras. O presente estudo mostra um método para confecção destas amostras seguindo um protocolo visando minimizar tais complexidades.

Alguns estudos[8,30,65] já mostravam que a avaliação de tecidos ósseos com implantes estuda basicamente a osseointegração. Esta é descrita como a condição clínica que permite carga funcional sobre os implantes dentários [30] e histologicamente, consiste no contato direto entre osso e implante [65]. Esse processo envolve uma complexa ordem de eventos e a resposta tecidual que promove a osseointegração dos implantes depende de vários fatores como a superfície do implante, sítio anatômico, trauma cirúrgico, tempo de cicatrização, entre outros [8].

Conseqüentemente, nos últimos anos, muitos estudos experimentais em animais [63,66-68] foram executados com o objetivo de investigar os diferentes estágios de osseointegração seguindo a inserção de vários tipos de implantes de titânio com diferentes designs e modificações de superfície. A primeira descoberta na maioria desses estudos foi a porcentagem de um novo contato osso-implante, acessado histomorfometricamente por meios de coloração convencional de áreas descalcificadas e não-descalcificadas de tecidos.

Com isso, quando temos um implante de titânio junto a análise aumentamos a complexidade de produzir uma boa amostra para análise. O uso de um ácido que é necessário para confecção das lâminas histológicas ósseas causa extensos danos ou até total avaria na amostra, pois o titânio e suas ligas apresentam corrosão apreciável apenas em soluções concentradas de alguns ácidos, particularmente os ácidos fluorídricos, clorídrico, sulfúrico, fosfórico, oxálico e fórmico, além de quaisquer soluções contendo o íon fluoreto[69-71]. O que ratifica o protocolo apresentado neste estudo, onde não há a necessidade de ácido descalcificador para confecção da amostra.

O uso de serras ou brocas metálicas e/ou diamantadas sobre o tecido ósseo e sobre o implante se tornou uma opção ao invés do uso de ácidos na confecção das amostras, entretanto seu uso é prejudicado quando avaliamos os estudos de Sharawy M. e colaboradores[72] que mostram que independentemente do tipo de osso, tempo e pressão exercidos no local

teremos um superaquecimento ósseo, possibilitando danos nas amostras, no tecido ósseo a ser analisado e na interface do implante. O protocolo de preservação óssea não mostrou danos ao tecido ósseo nem a interface implante-osso, pois não sofre de alto aquecimento em sua confecção como descrito neste estudo.

A metodologia e resultados expostos no presente estudo mostram que o uso do ultrassom com irrigação para retirada do implante ou testes de pull-out [63,73], também não são suficientes para uma correta avaliação da interface implante e tecido ósseo. Eles mostraram claramente a perda da interface óssea junto ao implante para confecção da lâmina histológica. Entretanto, são métodos auxiliares para avaliação de osseointegração em termos de força de aderência e qualidade de osseointegração.

Todas estas dificuldades citadas anteriormente são demonstrativas da necessidade de um padrão de confecção de amostras para avaliação da osseointegração, como o protocolo de preservação óssea apresentado no presente estudo. O qual possibilitou a análise crítica do contato osso-implante e regiões de neoformação óssea, sem defeitos ou amostra debilitada.

Em relação ao BIC, o método proposto no trabalho teve sucesso para aferição e verificação. Se buscarmos nos estudos a definição original de osseointegração, ela foi baseada em observações em nível de microscopia óptica, como “uma conexão estrutural e funcional direta entre osso vivo organizado e a superfície de um implante suportando carga” [74]. No entanto, esta definição, nem estudos atuais, indicam que porcentagem de osso precisa estar em contato com o implante para que este fenômeno possa ser chamado osseointegração.

Isto tem um fator significativo para os resultados obtidos pelo protocolo de preservação óssea apresentado, onde só temos a visualização de tecido ósseo mineralizado já em contato com o implante e não regiões sem formação óssea ou áreas fibrosas, mostrando apenas regiões de total contato osso-implante, as quais proporcionam perfeita aferição e avaliação.

Contudo, a mensuração desta porcentagem de contato osso-implante e sua avaliação, são motivos de muitos estudos atualmente. As imagens adquiridas das amostras confeccionadas pelo protocolo de preservação mostram com grande clareza a união do implante e sua superfície com o tecido ósseo, e proporcionam a aferição se for o caso.

Estudos onde essa taxa de contato osso-implante tem sido reportada mostram, entre 25 e 65% para superfície de titânio comercialmente puro (Ti-cp) e de 45 a 70% para superfícies de titânio tratadas, de contato osso-implante, tanto para estudos em animais[63,66-68,77], quanto em humanos[75-76]. Confirmando a necessidade de excelentes técnicas para análise e mensuração do BIC como o método de amostragem proposto neste estudo.

Não se consegue ainda, analisar e aferir a osseointegração por apenas um método, são necessários vários os tipos de análises para se mostrar a qualidade da osseointegração. A técnica apresentada para confecção das amostras amplia e qualifica esses métodos pela sua qualidade amostral e forma de confecção, proporcionando análises fiéis e qualidade para pesquisas usando esta metodologia.

7 CONCLUSÕES

O protocolo proposto gerou amostras de qualidade tanto com tecido ósseo sem implantes como com implantes, sem danos, aquecimento ósseo exagerado ou perda de qualidade.

O "protocolo de preservação óssea" se mostrou significativamente superior na análise de tecidos ósseos com implantes em relação à análise pelo método histológico do mesmo tipo amostral. Pela sua preservação do tecido ósseo na interface implante e osso, pela sua qualidade amostral, pela possibilidade de análise do BIC e aferição; todas essas vantagens sem a retirada do implante ou danos à amostra. Enquanto o método histológico não proporcionou nenhuma destas análises.

Na comparação de amostras com tecidos ósseos sem implantes pelas duas técnicas (protocolo de preservação e coloração por HE), as características ósseas e possibilidades de análises ósseas foram superiores no método de lâminas por coloração HE, pela sua vantagem em mostrar todas as características orgânicas com total evidência em relação ao "protocolo de preservação óssea", que tem seu predomínio de visualização pela parte inorgânica.

O protocolo apresentado no trabalho apresentou um modelo excelente para análise da qualidade da osseointegração de implantes no tecido ósseo, porém deve ser usado como auxiliar para averiguação quando o objetivo é análise de força de osseointegração, a qual é aferida com outros testes.

A qualidade, força e estabilidade de osseointegração de implantes de titânio não podem ser medidas por somente um protocolo ou método até o

momento atual, mas o protocolo proposto em conjunto com outras técnicas, se torna um método muito eficaz para facilitar a análise da osseointegração.

8 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

O protocolo de preservação óssea se mostrou um ótimo modelo para confecção de amostras com tecido ósseo sem implantes e com implantes; apresentou qualidade excelente para diagnóstico do BIC em amostras com implantes, para avaliação de osseointegração e para análise da superfície do implante de titânio utilizado.

Entretanto, a maioria dos trabalhos com tecidos vivos e em grande parte das escolas que estudam áreas biológicas, predomina-se o uso de corantes acidófilos e basófilos ou outros tipos de corantes, para diferenciação de elementos orgânicos ou inorgânicos pela sua composição.

O protocolo apresentado e suas amostras não foram testados com o uso de corantes, como são usados na confecção de lâminas de tecido ósseo por coloração HE, seguindo este padrão usual das áreas biológicas. Esta nova proposta de trabalho e análises a partir deste modelo, pode apresentar diferentes imagens e comparações do que as apresentadas neste trabalho e ainda pode se aproximar em características de análises como a coloração por HE em tecidos ósseos.

9REFERÊNCIAS:

- [1]- BRANEMARK, P.I. Et al. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.**, Stockholm, v.3, no.2, p. 81-100, 1969.
- [2]- GROISMAN M.; Vidigal-jr G.M. Tipos de superfícies de implantes. In: *Sobrape. (Org.). Periodontia e Implantodontia - Atuação clínica baseada em evidências científicas.* **Sobrape**; 2005.v.14, p.1-14.
- [3]- PARK, J. W.; Kim, H.K.; Kim, Y. J.; Jang, J. H.; Song, H.; Hanawa, T. Osteoblast response and osseointegration of a Ti-6Al-4V alloy implant incorporating strontium. **Acta Biomaterialia** 6 (7), 2843-51 (2010).
- [4]- LANG, L. A.; May, K.B.; Wang, R-F. The effect of the use of a counter-torque device on the abutment-implant complex.**The Journal of Prosthetic Dentistry** 81 (4), 411-7 (1999).
- [5]- KIM, S.H.; Choi, B.H.; Li, J.; Kim, H.S.; Ko, C-Y.; Jeong, S.M.; Xuan, F.; Lee, S.H. Peri-implant bone reactions at delayed and immediately loaded implants: an experimental study.**Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, 105 (2), 144-8 (2008).
- [6]- CUNHA, A.; Renz, R.P.; Blando, E.; De Oliveira, R.B.; Hübler, R. Osseointegration of atmospheric plasma-sprayed titanium implants: Influence of the native oxide layer.**J. Biomed.Mater. Res.A**102 (1), 30-6 (2014).
- [7]- RONOLD, H. J.; Lyngstadaas, S. P.; Ellingsen, J. E. Analyzing the optimal value for titanium implant roughness in bone attachment using a tensile test. **Biomaterials** 24, 4559-64 (2003).

- [8]- SALOU, L.; Hoornaert, A.; Louarn, G.; Layrolle, P. Enhanced osseointegration of titanium implants with nanostructured surfaces: An experimental study in rabbits. **Acta Biomaterialia** 11, 494-502 (2015)
- [9]- LÓPEZ, J.C.R.R. **Avaliação histomorfométrica do percentual de osseointegração ao redor de implantes recobertos por hidroxiapatita por meio de dois métodos de secção histológica.** 2007. Dissertação – Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, 2007.
- [10]- SOUZA, F.A. **Estudo comparativo in vivo de implantes Ti-cp com superfícies comerciais e modificadas por laser sem e com depósito de sílica: Análises biomecânica, topográfica e histométrica.** 2010. Tese – Universidade Estadual de São Paulo. Araçatuba, São Paulo. 2010.
- [11]- GUIMARÃES, K.B. **Fotoengenharia do processo de reparo ósseo induzido pela laserterapia de baixa potência (GaAlAs): estudo em fêmures de ratos.** 2006. Dissertação – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.
- [12]- ROSS, M.H, Romrell, L.J. **Histologia, Texto e Atlas.** São Paulo: Panamericana, 1993, p.141-79. 74
- [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, R., **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]- LERNER UH. Cystatin C. An inhibitor of bone resorption produced by osteoblasts. **Acta Physiol. Scand.** 1997; 161:81-92.
- [17]- TRISTRAM, G. et al. **Imunologia Médica,** Ed. Guanabara Koogan, 2004.

- [18]- ROBBINS C. **Pathologic Basis of Disease** - Kumar, Abbas and Fausto (eds) 7th Edition - International Edition
- [19]-<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/FisiologiaAnimal/sustentacao2.php>
- [20]- WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials** V.29, p. 2941-2953, 2008.
- [21]- CRAWFORD, G.A. et al. Microstructure and deformation behavior of biocompatible TiO₂ nanotubes on titanium substrate. **Acta Biomaterials**. V. 3, p.350-367, 2007.
- [22]-WALL, I.; et al. Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro. *Bone*, 2009.
- [23]- SPIEKERMANN, H. **Implantologia**, Porto Alegre, Artmed, p. 388, 2000.
- [24]-ERIKSEN, E. F.; Kassem, M.; Langdahl, B. Growth hormone, insulin-like growth factors and bone remodeling. **Eur J Clin Invest**.; 26: 252-64, 1996.
- [25]- ALBREKTSSON, T. On long-term maintenance of the osseointegrated response. *Aust. Prosthodont. J. Westmead*, v.7, suppl, p.15-24, 1993.
- [26]- ZARB, G.A.; Albrektsson, T. Osseointegration: a requiem for the periodontal ligament. **Int. J. Periodont. Res. Dent.**, Chicago, v.11, p.88-91, 1991.
- [27]- CUNHA, A. et al. A surgical procedure using sheep as an animal model to evaluate osseointegration. *Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica / Journal of Dental Clinics and Research*, v. 3, p. 59-62, 2007.
- [28]- RENZ, R. P. osseointegration evaluation of treated surfaces of titanium implants applying tensile pull out test. *Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica / Journal of Dental Clinics and Research*, v. 3, p. 149-157, 2007.
- [29]- CUNHA, A. **Avaliação do Crescimento Ósseo em Implantes de Titânio Revestidos por Plasma Spraying com diferentes Interfaces metal – filme.**

Porto Alegre. 2008. Mestrado em Engenharia e tecnologia de Materiais. PUCRS, Brasil.

[30]- ADELL, R. et al. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. **Int.J.OralSurg.**, Copenhagen, v.10, no.6, p. 387-416, Dec. 1981.

[31]- BUSER, D. et al. Tissue integration of one-stage ITI implants: 3 year results of a longitudinal study with Hollow-Cylinder and Hollow-Screw implants. **Int J. Oral Maxillofac.Implants**, Lombard, v.6, no.4, p. 405-412, 1991.

[32]- LAZZARA, R. et al. Restrospective multicenter analysis of 3i endosseous dental implants placed over a five-year period. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.7, no.1, p. 73-83, Mar. 1996.

[33]- BRUNSKI, J. The influence of force, motion and related quantities on the response of bone to implants. In: **Non-cemented total hip arthroplasty**.New York: Raven, 1988.

[34]- THOMAS, K.A.; Cook, S.D. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. **J.Biom.Mater Res.**, Hoboken, v.19, no.8, p.875-901, Oct, 1985.

[35]- MUSTAFA, K. et al. Effects of titanium surfaces blasted with TiO₂ particles on the initial attachment of cells derived from human mandibular bone. A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.11, no.2, p. 116-128, Apr. 2000.

[36]- SUL, Y.T. et al. Oxidized Implants and their influence on the bone response. **J.Mater Sci. Mater Med.**, Norwell, v.12, p. 10-12, Oct. /Dec. 2001.

[37]- COCHRAN, D. L. et al. Laser GaAIAs (860nm) photobiomodulation for the treatment of bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 30, no. 5, p. 293-297, May 2012.

[38]- RYAN, G. et al. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. **Biomaterials**. V. 27, p. 2651-2670, 2006.

- [39]- PULEO, D. A. Implant Surfaces. **The Dental Clinics of North America**.V.50, p. 323-338, 2006.
- [40]- AGHELI, H. Nanostructure Biointerfaces. **Materials Science and Engineering**. V. 26, p. 911-917, 2006.
- [41]-SCHWARTZ, Z. et al., Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. **Journal of Cell Biochemistry**, v. 56, n.3, p. 340-347, 1994.
- [42]- SCHLIEPHAKE, et al. Effect of modifications of dual acid-etched implant surfaces, **Journal compilation**, 2009.
- [43]- 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.OralImpl. Res.** 20, 2009
- [44]- PARK J.Y., Davies J.E. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. **Clin Oral Impl Res** 2000; 11:530-9.
- [45]- BUSER D., Broggini N., Wieland M., Schenk R. K., Denzer A. J., Cochran D. L. et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. **J Dent Res** 2004; 83(7):529-33.
- [46]- OATES T.W., Valderrama P., Bischof M., Nedir R., Jones A., Simpson J. et al. Enhanced implant stability with a chemically modified SLA surface: a randomized pilot study. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2007; 22(5):755-60.
- [47]- CONSERVA E.; Menini M.; Ravera G.; Pera P. The role of surface implant treatments on the biological behavior of SaOS-2 osteoblast like cells. An in vitro comparative study. **Clin.OralImpl.Res** v.24, p.880–889, 2013.
- [48]- MEIRELLES L., Currie F., Jacobsson M., Albrektsson T., Wennerberg A. The effect of chemical and nanotopographical modifications on the early stages of osseointegration. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2008; 23(4):641-7.
- [49]- SHIBLI J.A.; Grassi S.; Piattelli A.; Pecora G.E.; Ferrari D.S.; Onuma T.; D'avila S.; Coelho P.G.; Barros R.; Iezzi G. Histomorphometric evaluation of bioceramic molecular impregnated and dual acid-etched implant surfaces in the

human posterior maxilla. **ClinImpl Dent and Rel Research**, v.12, p.281-288, 2010.

[50]- TRISI P.; Lazzara R.; Rao W.; Rebaldi A. Bone-implant contact and bone quality: evaluation of expected and actual bone contact on machined and osseotite implant surfaces. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v.22, p.535–545, 2002.

[51]- DAVIES, J.E. Mechanisms of endosseous integration. **Int J Prosthodont**, v.11, p.391–401, 1998.

[52]- KARABUDA Z.C.; Abdel-haq J.; Arisan V. Stability, marginal bone loss and survival of standard and modified sand-blasted, acid-etched implants in bilateral edentulous spaces: a prospective 15-month evaluation. **Clin.OralImpl.Res.**, v.22, p.840–849, 2011.

[53]- SAGIRKAYA E.; Kucukekenci A.S.; Karasoy D.; Akça K.; Eckert S.; Çehreli M.C. Comparative Assessments, Meta-Analysis, and Recommended Guidelines for Reporting Studies on Histomorphometric Bone Implant Contact in Humans. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.28, p.1243– 1253, 2013.

[54]- BONFANTE E.A.; Granato R.; Marin C.; Suzuki M.; Oliveira S.R.; Giro G.; Coelho P.G. Early Bone Healing and Biomechanical Fixation of Dual Acid-Etched and As-Machined Implants with Healing Chambers: An Experimental Study in Dogs. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.26, p.75–82, 2011.

[55]- COCHRAN D.L.; Jackson J.N.; Bernard J.P.; Bruggenkate C.M.T.; BuserD.; Taylor T.D.; Wengart D.; Schoolfields J.D.; Jones A.A.; Oates T.W. A 5-year prospective multicenter study of early loaded 95 titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.26, p.1324–1332, 2011.

[56]- BIGGS M.J.; Richards R.G.; Gadegaard N.; McMurray R.J.; Affross-man S.; Wilkinson C.D.; Oreffo R.O.; Dalby M.J. Interactions with nanoscale topography: Adhesion quantification and signal transduction in cells of osteogenic and multipotent lineage. **J Biomed Mater Res A**, v.91, p.195-208, 2009.

- [57]- STEVENS M.M.; George J.H. Exploring and engineering the cell surface interface. **Science**, v.310, p.1135–1138, 2005.
- [58]- STEVENS, Alan; LOWE, James. **Histologia**. São Paulo: Manole, 1995.
- [59]-ORÉFICE R.L., Pereira M.M., Mansur, H.S., **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**, 1 ed. Rio de Janeiro, Cultura Médica 2006.
- [60]- JUNQUEIRA L.C, CARNEIRO J, **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 111-128, 2004.
- [61]- GARTNER, LESLIE P. **Tratado de histologia em cores**. Traduzido do original: COLOR TEXTBOOK OF HISTOLOGY. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 456 p.
- [62]- POST, L. K. **Análise comparativa do efeito de diferentes superfícies sobre a resposta tecidual perimplantar em regiões com baixa densidade óssea: modelo animal coelho**. 2009. 65 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- [63]-PIATTELLI A., Scarano A. Quaranta M. High-precision, cost-effective system for producing thin sections of oral tissues containing dental implants.**Biomaterials**. 1997; 18: 577-579
- [64]- MAROTTI G., Farneti D., Remaggi F., Tartari F. Morphometric investigation on osteocytes in human auditory ossicles. **AnatAnz**1998 Oct.; 180 (5): 449-53.
- [65]-BRÅNEMARK, P. I. et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period.Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery. **Supplementum**, v. 16, p. 1–132, 1977.
- [66] - BUSER D., Nydegg T., Oxland T., Cochran D.L., Schenk R.K., Hirt H.P., Snétivy D., Nolte L.P. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. **J Biomed Mater Res**. 1999; 45: 75-83.
- [67] -BUSER D., Schenk R.K., Steineman S. Fiorellini J.P., Fox C.H., Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A

histomorphometric study in miniature pigs. **J Biomed Mater Res.** 1991; 25: 889-902

[68] - GOTFREDSEN K., Berglundh T., Lindhe J. Bone reactions adjacent to titanium implants subjected to static load of different duration. A study in the dog (III). **Clin Oral Implants Res.** 2001; 12: 552-558

[69]- FILHO, J. T. **Modificação Superficial de Titânio para a Produção de Implantes.** Rio de Janeiro. 2007. 120p. Mestrado em Engenharia Metalúrgica e Materiais. UFRJ, Brasil.

[70]- JONASOVA, L. et al. Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium. **Biomaterials.** V. 25, p. 1187-1194, 2004.

[71]- ROACH, M. Base Metal Alloys Used for Dental Restorations and Implants. **The Dental Clinics of North America.** V. 51, p. 603-627, 2007.

[72]- SHARAWY M., Misch C.E., Weller N., Tehemar S. Heat generation during implant drilling: the significance of motor speed. **J Oral Maxillofac Surg.** 2002 Oct; 60(10):1160-9

[73]- HANAWA, T., Kamiura, Y., Yamamoto, S., Kohgo, T., Amemiya, A., Ukai, H., Murakami, K. AndAsaoka, K., Early bone formation around calcium-ion-implanted titanium inserted into rat tibia. **J. Biomed. Mater. Res.**, 36: 131–136 (1997).

[74]-ALBREKTSSON, T. et al. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. **Acta orthopaedica Scandinavica**, v. 52, n. 2, p. 155–170, 1981.

[75]-KIM Y.H., Koak J.Y., Chang I.T., Wennerberg A., Heo S.J. A histomorphometric analysis of the effects of various surface treatment methods on osseointegration. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2003; 18: 349-56

[76]- PROUSSAEFS P., Olivier H-S., Lozada J. Histologic evaluation of 12-year-old threaded hydroxyapatite-coated implant placed in conjunction with subantral augmentation procedure: A clinical report. **J Prosthet Dent.** 2004; 92: 17-22

[77]-PALMQUIST, A; Emanuelsson, L; Brånemark, R.; Thomsen, P. Biomechanical, histological and ultrastructural analyses of laser micro- and nano-structured titanium implant after 6 months in rabbit. **J. Biomed. Mater. Res. B** 97, 289-98 (2011).

ANEXO A



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



Ofício 030/08-CEUA

Porto Alegre, 07 de maio de 2008.

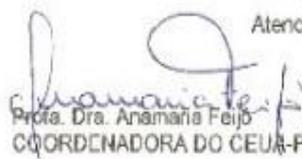
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 08/00020, intitulado: "Avaliação do efeito da LLLT no processo de osseointegração de implantes de Ti".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios do andamento do projeto devem ser entregues a este Comitê.

Atenciosamente,


Prof. Dra. Anamaria Feijó
COORDENADORA DO CEUA-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Prof Roberto Hübler
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 669C - 3º andar sala 314 - CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO B

NORMAS PARA PRÁTICA DIDÁTICO-CIENTÍFICA DA VIVISSECÇÃO DE ANIMAIS

Lei 6638, de 08 de maio de 1979

Art. 1º - Fica permitida, em todo o território nacional, a vivissecção de animais, nos termos desta Lei.

Art. 2º - Os biotérios e os centros de experiências e demonstrações com animais vivos deverão ser registrados em órgão competente e por ele autorizados a funcionar.

Art. 3º - A vivissecção não será permitida:

- I - sem o emprego de anestesia; II - em centros de pesquisas e estudos não registrados em órgão competente;
- III - sem supervisão de técnico especializado;
- IV - com animais que não tenham permanecido mais de 15 (quinze) dias em biotérios legalmente autorizados;
- V - em estabelecimento de ensino de 1o. e 2o grau e em quaisquer locais freqüentados por menores de idade.

Art. 4º - O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos das experiências que constituem a pesquisa ou os programas de aprendizagem cirúrgica, quando, durante ou após a vivissecção, receber cuidados especiais.

§ 1º - Quando houver indicação, o animal poderá ser sacrificado sob estrita obediência às prescrições científicas;

§ 2º - Caso não sejam sacrificados, os animais utilizados em experiências ou demonstrações somente poderão sair do biotério 30 (trinta) dias após a intervenção, desde que destinados a pessoas ou entidades idôneas que por eles queiram responsabilizar-se.

Art. 5º - Os infratores desta Lei estarão sujeitos:

- I - às penalidades cominadas no artigo 64, caput, do Decreto-lei 3.688, de 03/10/41, no caso de ser a primeira infração;
- II - à interdição e cancelamento do registro do biotério ou do centro de pesquisas, no caso de reincidência.

Art. 6º - O Poder Executivo, no prazo de 90 (noventa) dias, regulamentará a presente Lei, especificando:

- I - o órgão competente para o registro e a expedição de autorização dos biotérios e centros de experiências e demonstrações com animais vivos;
- II - as condições gerais exigíveis para o registro e o funcionamento dos biotérios;
- III - órgão e autoridades competentes para fiscalização dos biotérios e centros mencionados no inciso I.

Art. 7º - Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 8º - Revogam-se as disposições em contrário.

