A grayscale microscopic image showing a dense, fibrous tissue structure, likely a cross-section of muscle or connective tissue. The fibers are arranged in a somewhat parallel, wavy pattern, with some darker, more irregular regions interspersed. The overall appearance is that of a complex, layered biological material.

MARCELO KAYATT LACOSKI

**REAÇÃO TECIDUAL À SUPERFÍCIE DE TITÂNIO TRATADA
PELA IRRADIAÇÃO LASER E HIDROXIAPATITA: ANÁLISE
HISTOMORFOMÉTRICA EM RATOS**

Araçatuba - Estado de São Paulo
Dezembro de 2005

MARCELO KAYATT LACOSKI

**REAÇÃO TECIDUAL À SUPERFÍCIE DE TITÂNIO TRATADA
PELA IRRADIAÇÃO LASER E HIDROXIAPATITA: ANÁLISE
HISTOMORFOMÉTRICA EM RATOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba – UNESP como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-
Maxilo-Facial

Orientador: Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior

Araçatuba – Estado de São Paulo

Dezembro de 2005

MARCELO KAYATT LACOSKI

Nascimento Ponta Porã – 16 de agosto de 1980

MS

Filiação

João Marcos Lacoski

Maria Célia Esgaib Kayatt Lacoski

1998 – 2001

Graduação – Curso de Odontologia –
Universidade Federal de Mato Grosso do
Sul

2002 – 2003

Pós-graduação – Especialização em
Periodontia – Faculdade de Odontologia
de Araraquara – UNESP

2004 – 2005

Pós-graduação – Mestrado em
Odontologia – Área de concentração:
Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-
facial – Faculdade de Odontologia de
Araçatuba – UNESP

Dedico este trabalho aos meus pais que me deram todo apoio, carinho e compreensão por esse percurso e que sempre estiveram confiantes na minha dedicação.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. **IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR** pelos ensinamentos transmitidos, carinho, amizade e confiança constante na confecção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **OSVALDO MAGRO FILHO**, Dinho, pela grande amizade, companheirismo.

Ao Prof. Dr. **TETUO OKAMOTO** pelo exemplo de integridade e humildade.

À Prof. Dra. **ROBERTA OKAMOTO**, pelo grande carinho e dedicação dispensados a todos os acadêmicos.

Aos professores da Disciplina de Clínica Integrada Prof. Dr. **WILSON ROBERTO POI**, Prof. Dra. **SÔNIA REGINA PANZARINI BARIONI** e Prof. Dr. **CELSO KOOGI SONODA** pela disponibilidade, sempre com uma palavra amiga e sincera.

Aos colegas de equipe **THAIS SILVEIRA RODRIGUES**, **CAROLINA CHIANTELLI CLAUDIO COUTINHO**, **CRISTIANO GAUJAC**, **EDUARDO FACO**, pela dedicação e aprendizado juntos nos plantões.

Ao amigo **LEANDRO CARVALHO CARDOSO** pela disponibilidade e incentivo na carreira científica.

Ao meu primo e colega **DANIEL LIMA KAYATT** companheiro de todas as horas.

Ao meu padrinho, colega e amigo **FERNANDO ESGAIB KAYATT** pelo constante interesse e incentivo, grande mentor e guia da minha carreira.

A minha namorada **CLAUDINHA** por me fortalecer com seu amor e sempre compreender a minha ausência.

AGRADECIMENTOS

À **FACULDADE DE ODONTOLOGIA DO CAMPUS DE ARAÇATUBA, UNESP**, na pessoa do seu Diretor **PAULO ROBERTO BOTACIN**, pelas condições oferecidas para realização da pesquisa.

À **CNPQ** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão de bolsa de estudo para efetivação da formação universitária.

Aos **ANIMAIS** que participaram neste estudo, permitindo que esse trabalho pudesse ser realizado.

Aos **FUNCIONÁRIOS** do **DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E CLÍNICA INTEGRADA**, da **FACULDADE DE ODONTOLOGIA DO CAMPUS DE ARAÇATUBA – UNESP**: **ANA CLÁUDIA MACEDO, BERNADETE MARIA NUNES KIMURA, GILMAR MARTINS DE OLIVEIRA, GLAUCO JOSÉ DE CARVALHO, MARIA DIRCE C. BOATTO**, pela forma carinhosa com que nos acolheram.

Aos **FUNCIONÁRIOS DA PÓS-GRADUAÇÃO**, em especial à **MARINA MIDORI S. KAWAGOE E VALÉRIA DE QUEIROZ M. ZAGATTO**, pelo sorriso e atenção que sempre dispensaram.

Aos amigos da pós-graduação: **ANDRÉ DOTTO SOTTOVIA, FÁBIO TANAKA, HELEN RAMON ESPER, JORDAN LIMA DA SILVA, JOSÉ LUÍS LELES, PAULO ALMEIDA JÚNIOR, NATASHA MAGRO ÉRNICA, THAIS MARA MANFRIN, VINÍCIUS PALMA**

**CANAVARROS, PAULO DOMINGOS RIBEIRO JÚNIOR, ELEONOR
ÁLVARO GARBIN JÚNIOR, LILIANE SCHEIDDEGER DA SILVA
ZANETTI, CAMILA BENEZ RICIERI, THALLITA PEREIRA QUEIROZ,
FRANCISLEY ÁVILA DE SOUZA, JÉSSICA LEMOS GUINELLI.** No
caminhar de nossa evolução, como humanos, permanecer neste espaço
com vocês, foi uma experiência dignificante.

“Sentir primeiro, pensar depois
Perdoar primeiro, julgar depois

Amar primeiro, educar depois
Esquecer primeiro, aprender depois

Libertar primeiro, ensinar depois
Alimentar primeiro, cantar depois

Possuir primeiro, contemplar depois
Agir primeiro, julgar depois

Navegar primeiro, aportar depois
Viver primeiro, morrer depois.”

Mário Quintana

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
RESUMO.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3. MATERIAL E MÉTODO.....	20
3.1. PREPARAÇÃO DOS IMPLANTES SUBCUTÂNEOS.....	21
3.2. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	23
3.3. PROCESSAMENTO LABORATORIAL PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	26
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4. RESULTADO.....	28
5. DISCUSSÃO.....	38
6. CONCLUSÃO.....	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
ABSTRACT.....	48
ANEXOS.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	1a - Fotomicrografia mostrando o disco tratado com Laser. MEV 500x	
	1b - Fotomicrografia mostrando o disco tratado com laser e deposição de HA. MEV 500x.....	22
Figura 2	2a – Fotomicrografia do disco tratado com laser. MEV 10.000x.	
	2b – Fotomicrografia do disco tratado com laser e deposição de HA. MEV 10.000x.....	22
Figura 3	Região do dorso tricotomizada.....	24
Figura 4	Acesso cirúrgico.....	24
Figura 5	Divulsão do tecido subcutâneo.....	24
Figura 6	Implantação do corpo de prova.....	25
Figura 7	Sutura do acesso cirúrgico.....	26
Figura 8	LA 3 dias 250x.....	29
Figura 9	LHA 3 dias 250x.....	29
Figura 10	LA 7 dias 250x.....	30
Figura 11	LHA 7 dias 250x.....	31
Figura 12	LA 14 dias 250x.....	32
Figura 13	LHA 14 dias 250x.....	33
Figura 14	LA 21 dias 250x.....	34
Figura 15	LHA 21 dias 250x.....	35
Gráfico 1	Média das espessuras das cápsulas fibrosa em contato com os discos de prova.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores obtidos nas mensurações das cápsulas fibrosas.....	36
Tabela 2; 3	Teste estatístico de Kruskal-Wallis.....	37
Tabela 4	Valores das médias dos valores das espessuras das cápsulas fibrosas.....	50

Resumo

LACOSKI, M.K. Reação tecidual à superfície de titânio tratada pela irradiação laser e hidroxiapatita: análise histomorfométrica em ratos. Araçatuba, 2005. 50p Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

O tratamento de superfície dos implantes está consolidado como um método capaz de acelerar e melhorar a qualidade da osseointegração, possibilitando técnicas de carregamento precoce dos implantes, diminuindo o tempo de tratamento e o número de insucessos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi observar o comportamento celular do tecido subcutâneo de ratos submetidos a implantes de discos de titânio tratados com laser e laser e hidroxiapatita. Para isso, foram utilizados 32 discos de Ti cp implantados no tecido subcutâneo da região dorsal anterior e posterior de 16 animais (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), divididos em 2 grupos: LA – discos tratados com irradiação laser e LHA – discos tratados com irradiação laser e deposição de hidroxiapatita pelo método biomimético. Na análise histológica pôde-se observar que houve formação conjuntiva na periferia das amostras de titânio, com espessura e presença celular semelhantes, em ambos os grupos. Qualitativamente, o grupo LHA mostrou melhor organização tecidual nos tempos iniciais. Na análise morfométrica houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, para $\alpha > 0,01$

Palavras-chave: Implante dentário. Laser. Hidroxiapatita.

1. INTRODUÇÃO

O uso de implantes osseointegrados, tem se difundido na reposição de dentes perdidos, possibilitando diferentes tipos de tratamentos reabilitadores em pacientes edêntulos totais e parciais, com alto nível de previsibilidade. Uma razão essencial para este sucesso clínico observado é a interface de osseointegração estabelecida entre o implante e o tecido ósseo.²⁰

O tratamento da superfície dos implantes através de jateamentos e ataques ácidos, tornando-a rugosa, está consolidado como um método capaz de acelerar e melhorar a qualidade da osseointegração, possibilitando técnicas de cargas protéticas precoces sobre os implantes, diminuindo o tempo de tratamento e o número de insucessos.

Mediante novas tendências de caracterização de superfície dos implantes de titânio, o objetivo deste estudo é comparar o comportamento do tecido subcutâneo de ratos, submetido a implantes de discos de titânio com superfícies tratadas com irradiação laser somente e associado a hidroxiapatita, visando criar uma superfície que reúna os benefícios de ambas as técnicas de texturização.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Os estudos de BRANEMARK et al⁷ e SCHROEDER et al,³⁰ a respeito do ancoramento com contato direto entre os implantes e o tecido ósseo de suporte, condição denominada de osseointegração. É definida por ALBREKTSSON & SENNERBY² como uma interface onde há o contato direto do tecido ósseo com as superfícies dos implantes, sem a interposição de tecido mole sob a microscopia óptica. STEINEMAN et al³² definiram a osseointegração de uma maneira biomecânica mostrando ser uma resistência a forças de tração podendo ser explicada pelas uniões químicas entre o tecido ósseo e o implante.

Em 1993, RATNER²⁷ a definiu como sendo o aproveitamento que um material faz das proteínas e células do meio biológico onde é colocado de forma a satisfazer a meta específica de seu desempenho, sugerindo um papel central das proteínas na interface e no processo de reconhecimento celular, salientando ainda, que a propriedade intrínseca da superfície do implante é que comanda a resposta biológica.

THOMAS & COOK³³, em 1985, procuraram avaliar os fatores que influenciavam na deposição óssea direta sobre diferentes

materiais biocompatíveis. Estudaram o módulo de elasticidade dos materiais, composição da superfície e a sua textura, alternando combinações, com o objetivo de identificar a melhor interface osso/material. Entre os materiais avaliados encontrava-se o titânio comercialmente puro, com superfícies polidas e rugosas. Os resultados mostraram que a textura da superfície do implante foi o que mais influenciou na deposição óssea direta, portanto, os implantes com superfície rugosa foram os que apresentaram maior resistência à remoção e contato com tecido ósseo, enquanto a superfície polida apresentava graus variados de formação tecidual fibrosa.

As propriedades da superfície dos implantes dependem, entre outros fatores, da rugosidade³¹ e da energia superficial,²¹ que podem ser alterados pelo tratamento superficial recebido pelos implantes. A energia superficial influencia diretamente a capacidade de um líquido de se esparramar sobre uma determinada superfície (molhabilidade). Contudo, é a rugosidade superficial o fator de maior importância na estruturação das propriedades superficiais dos implantes, já que a interação do biomaterial (metal) com os biofluidos e do metal com o tecido parece ser fortemente afetado por diferenças nas superfícies tratadas diferentemente de um mesmo material.^{6, 14, 23} Além do mais, as propriedades físico-químicas da superfície dos materiais são afetadas pelo processamento da superfície.^{6, 21} Um exemplo dessa influência é a diferença significativa na medida da tensão superficial de um mesmo

material com rugosidade diferentes.²¹ E tanto a energia superficial como a rugosidade influenciam diretamente as respostas biológicas iniciais como a adesão,⁹ a multiplicação,^{6, 9, 23} a orientação^{2, 8, 15} e a migração celular.^{8, 9}

GAGGL¹⁷ et al, em 2000, analisaram o grau de contaminação e a característica da superfície de 4 tipos de implantes: usinado, revestido com spray de Ti, tratado com óxido de alumínio e tratado com LASER, utilizando microscopia eletrônica de varredura e “mechanical profilometry”. Em relação à pureza da superfície, os implantes usinados e tratados com LASER apresentaram o menor índice de contaminação. A topografia da superfície dos implantes tratados com LASER e com plasma spray de Ti apresentaram resultados similares. Esta topografia provê condições melhores para osseointegração, pois causa a proliferação de osteoblastos induzidos por citocinas. O grau de contaminação da superfície do Ti determina a estabilidade mecânica e a qualidade de osteoindução

BEREZNAI³ et al, em 2003, relataram a alteração da superfície de titânio, provocada pela irradiação de LASER KrF “excimer”. Por ablação foram criadas perfurações e realizado polimento com pulsos de LASER de ArF que removeu as projeções em forma de coroa das bordas, deixando a superfície tratada do Ti regular, retirando também impurezas como compostos carbônicos e óxidos. Esta característica

aumentaria a superfície de contato entre o osso e o implante e, portanto, facilitaria a osseointegração.

O progresso recente na tecnologia de laser tornou possível produzir novas superfícies do implante, introduzindo poros de geometria definida em implantes com precisão elevada e eficiência.⁴ GÖTZ¹⁸ et al, 2004, produziram superfícies de implantes de Ti texturizadas à laser com poros de 100, 200 e 300µm instalados em fêmures de coelhos. Relataram que, no período inicial de 3 semanas, não havia diferença significativa entre os grupos comparados com os implantes de superfície usinada. Porém, nos períodos de 6 e 12 semanas, a interface osso-implante era maior no grupo de 200µm, sugerindo que os mecanismos biológicos envolvidos no crescimento ósseo utilizam os poros para ancoragem inicial do osso neoformado.

HULBERT¹⁹ et al, em 1970, demonstraram que, para o desenvolvimento dos ósteons, são necessários poros com diâmetros entre 150 e 200µm em implantes cerâmicos. LI²² et al, em 1997, relataram que superfícies tratadas à laser requerem poros de, no mínimo, 140µm de diâmetro para a formação do ósteon. GÖTZ¹⁸ et al, 2004, encontraram remodelação óssea em poros com 100µm de diâmetro, embora com um pronunciado atraso em relação ao poros de diâmetro maiores.

Numerosas pesquisas com biomateriais bioativos contendo fosfatos de cálcio e a hidroxiapatita (HA) ocorreram durante a década de 80. Ambos são altamente biocompatíveis e devido às propriedades físicas

da HA. Cerâmicas de HA foram usadas em implantes médicos pela rápida e direta ligação ao tecido vivo do osso. Porém, a natureza frágil da HA requer que esta seja revestida em substratos mais resistentes, tais como o titânio ou o Ti6Al4V. O revestimento de HA permite a osseointegração mais rápida devido as suas propriedades de ligação ao tecido ósseo.⁵

Diversas técnicas de revestimento foram desenvolvidas: plasma spray, *ion beam-assisted deposition* ou deposição por eletroforese.^{16, 24} Os primeiros resultados clínicos com HA revestindo os implantes dentários eram encorajadores, mostrando uma boa taxa de sucesso, mesmo em osso de baixa qualidade. Entretanto, após períodos mais longos, falhas mecânicas ocorreram na interface HA-metal.²⁶ O revestimento de HA dissolve-se pelo baixo grau de cristalização da estrutura,³⁴ aumentando a perda de aderência com a superfície do titânio e a falha a longo prazo do implante.³⁵ Portanto, a estabilidade do revestimento de HA determina o sucesso deste tipo de implante. Este revestimento pode ser estabilizado com um depósito fino do HA altamente denso e cristalino, capaz de estabelecer uma ligação forte com a matriz óssea.¹³ Outro o problema identificado era a adesão mecânica pobre entre o revestimento e a superfície.¹⁶

BLIND⁵ et al, 2005, determinaram os parâmetros específicos da técnica de deposição laser pulsada (PLD) a fim de produzir películas finas cristalinas e aderentes do HA sobre superfícies de Ti e do Ti-6Al-4V. Os parâmetros avaliados foram: a natureza e a pressão dos gases no

interior da câmara de ablação; a temperatura da superfície metálica; os parâmetros do feixe de laser e distância entre o alvo e a superfície. Três técnicas diferentes – Microscopia Eletrônica de Varredura para a morfologia, o Microscopia de Força Atômica para a aspereza da topografia e o teste de micro-risca para verificar a adesão do revestimento – foram usadas para caracterizar as camadas finas do HA produzidas. Concluindo que as películas criadas são aderentes às superfícies pesquisadas e têm um elevado grau de cristalinidade induzindo o comportamento biológico dos implantes dentais.

3. MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 16 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), gênero masculino, pesando entre 200 e 250g, com procedência do Biotério Central da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (UNESP). Os animais foram aclimatados e mantidos em gaiolas unitárias de 25cm³, possibilitando espaço suficiente para sua movimentação e descanso, sob temperatura ambiente, iluminação e higiene controlada; alimentados com ração balanceada (Ração Ativada Produtor, Moinho Primor S/A.) e água a vontade. Os animais permaneceram isolados, para certificar-se de que estes estariam estáveis e saudáveis, mantendo contato apenas com as pessoas envolvidas no trabalho. O presente trabalho obteve aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia e de Medicina Veterinária de Araçatuba (UNESP), de acordo com protocolo nº 125/05 (anexo 2).

No presente estudo foram implantados no subcutâneo, 32 discos de Ti comercialmente puro com 6mm de diâmetro e 1,5mm de espessura, divididos em dois grupos:

- Grupo LA – Superfície tratada com LASER, implantados na região dorsal anterior esquerda;

- Grupo LHA – Superfície tratada com LASER e hidroxiapatita, implantados na região dorsal posterior direita.

3.1 PREPARAÇÃO DOS IMPLANTES

Todos os discos de Ti cp foram provenientes do Instituto de Química de Araraquara – UNESP e receberam o seguinte tratamento:

Grupo LA: Irradiação com laser de alta intensidade Nd-YAG, em atmosfera ambiente, com energia de $100\text{W}/\text{m}^2$, pulso de frequência de 35.000Hz, velocidade de varredura de 80mm/s, passo 1, espaço da matriz de 0,01cm e tempo 2 minutos e 07 segundos

Grupo LHA: Irradiação do mesmo tipo de laser. Os parâmetros de energia, pulso de frequência, velocidade de varredura e passo foram os mesmos aplicados no grupo laser. Houve variação de espaço da matriz e tempo de aplicação, que foi de 0,02cm e 1 minuto e 10 segundos, respectivamente. Para o recobrimento de apatita sobre os discos de Ti cp, utilizou-se o método biomimético, para uma enucleação mais lenta e organizada da apatita. Este método consiste em colocar o substrato a ser recoberto em uma solução sintética denominada Simulação dos Fluidos do Corpo (SBF – Simulated Body Fluid). Em anexo com o substrato coloca-se uma placa de vidro de composição: MgO 4,6%, CaO 44,7%, SiO₂ 34,0%, P₂O₅ 16,2%, CaF₂ 0,5% em peso, denominado vidro G bioativo. Este é colocado a uma distância de aproximadamente 0,5mm do substrato. Depois de mantido o sistema durante 7 dias a

36,5°C, é depositado uma camada contínua e homogênea de 1µm de espessura composta por cristalitos de HA biológica muitos finos e de aparência fibrosa. Através da reimersão durante 7 dias em uma solução 1,5 vezes mais concentrada do que a primeira obtém-se um aumento na espessura da camada em até 15µm.^{1, 31}

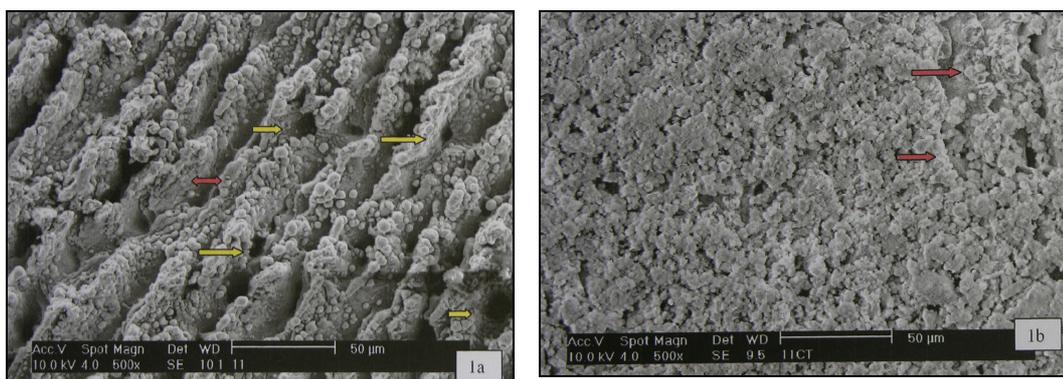


Figura 1 – 1a – Fotomicrografia mostrando o disco tratado com Laser em aumento de 500x sob MEV. Notam-se zonas de fusão e solidificação rápida resultando na presença de defeitos lineares com aproximadamente 25µm de espessura (Seta vermelha) e presença de poros na superfície (Setas amarelas). (SISTI, 2004)³¹

1b - Fotomicrografia mostrando o disco tratado com laser e deposição de HA em aumento de 500x sob MEV. Nota-se a presença de HA (Setas vermelhas) e aspereza superficial e homogeneidade. (SISTI, 2004)³¹

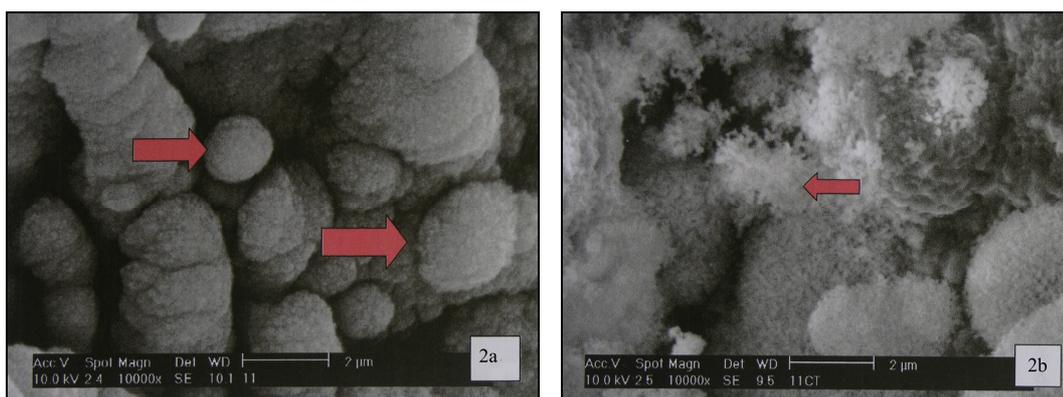


Figura 2 – 2a – Fotomicrografia do disco tratado com laser em aumento de 10.000x sob MEV, evidenciando a presença de esferas com rugosidade superficial e textura áspera (Setas vermelhas). (SISTI, 2004)³¹

2b – Fotomicrografia do disco tratado com laser e deposição de HA em aumento de 10.000x sob MEV, nota-se a presença de HA sobre as esferas (Seta vermelha) com característica de rugosidade superficial. (SISTI, 2004)³¹

3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais mantiveram jejum por oito horas pré-operatórias. A indução da anestesia geral foi realizada por infiltração intramuscular de cloridrato de quetamina a 10% (Ketamina Agener[®], União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo - SP, Brasil), na dosagem aproximada de 100mg/kg de peso corporal e cloridrato de xilazina (Rompum[®], Bayer S/A – Saúde Animal, Porto Alegre - RS, Brasil) na dosagem de 50mg/kg.

A região do dorso superior do animal foi tricotomizada (Figura 3) e sua anti-sepsia realizada com polivinil pirrolidona iodo degermante (PVP-I 10%, Riodeine degermante[®], Rioquímica, São José do Rio Preto - SP, Brasil).

O acesso cirúrgico (Figura 4) foi executado através de uma incisão dermal, com lâmina nº 15 (Feather[®], Feather Safety, Japan) montada em cabo de bisturi nº 3, sobre a linha média com extensão de 2cm (Figura 4). O tecido conjuntivo subcutâneo acessado através de divulsão com tesoura de Metzenbaum (Figura 5) e implantados os corpos de prova. (Figura 6)

O tecido mole foi reposicionado e suturado com pontos interrompidos com fio de nylon 5-0 (Mononylon[®], Ethilon[®], Etchicon[®], Johnson & Johnson[®], São José dos Campos - SP, Brasil). (Figura 7)

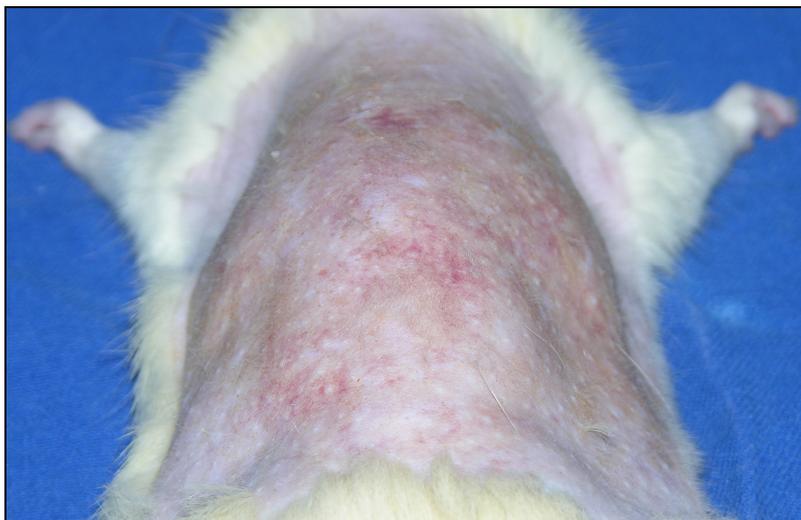


Figura 3 – Região do dorso tricotomizada



Figura 4 – Acesso cirúrgico



Figura 5 – Divulsão do tecido subcutâneo



Figura 6 – Implantação do corpo de prova



Figura 7 – Sutura do acesso cirúrgico

3.3 PROCESSAMENTO LABORATORIAL PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após os períodos experimentais de 3, 7, 14 e 21 dias pós-operatórios, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de inalação excessiva de éter sulfúrico.

Os espécimes obtidos foram fixados em solução de formalina a 10%, por 24 horas, seguindo-se então a tramitação laboratorial de rotina, para a inclusão em parafina.

Nos blocos assim obtidos, realizou-se a microtomia, colhendo-se cortes semi-seriados com 6 micrômetros de espessura e posteriormente corados pela hematoxilina e eosina, para análise microscópica computadorizada.

A avaliação morfométrica da espessura do tecido conjuntivo formado em contato com o disco de prova foi por meio de um sistema de análise digitalizada composto por uma câmera digital (JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera®) acoplada a um microscópio binocular (Carl Zeiss) conectado ao computador sob a avaliação do software ImageLab 2000 versão 2.4.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foram selecionadas cinco medidas aleatórias em lâminas, no aumento de 250x, de todos os períodos estudados e confrontadas entre si, através do teste estatístico de Kruskal-Wallis, utilizando o programa GMC 2002[®] (Geraldo Maia Campos, Ribeirão Preto - SP, Brasil).

4. RESULTADO

– 3 dias pós-operatórios:

Aos 3 dias pós-operatórios, no grupo LA, ocorre o início de deposição de fibras colágenas (A) junto aos discos implantados (D). O tecido conjuntivo frouxo exhibe área de infiltrado linfo-plasmocitário (setas) e esboço de formação capsular espessa. (Fig. 8)

Diferente é o aspecto neste período na maioria das imagens do grupo LHA. São poucas as células inflamatórias e bem definido o encapsulamento (CF), com fibras dispostas longitudinalmente e de pouca espessura. (Fig. 9)

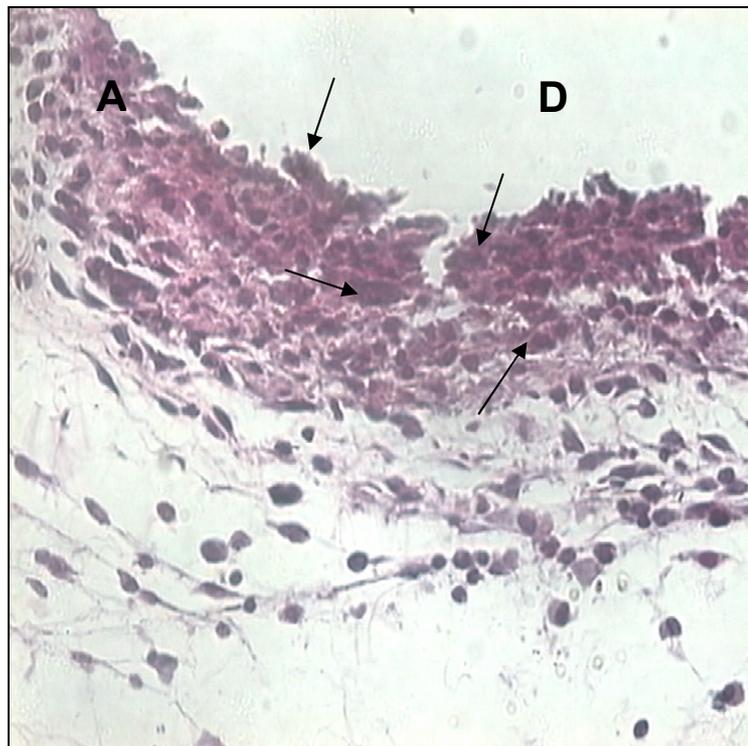


Figura 8 – LA 3 dias 250X – Área de contato (A) com o disco (D) exibindo células inflamatórias (setas).

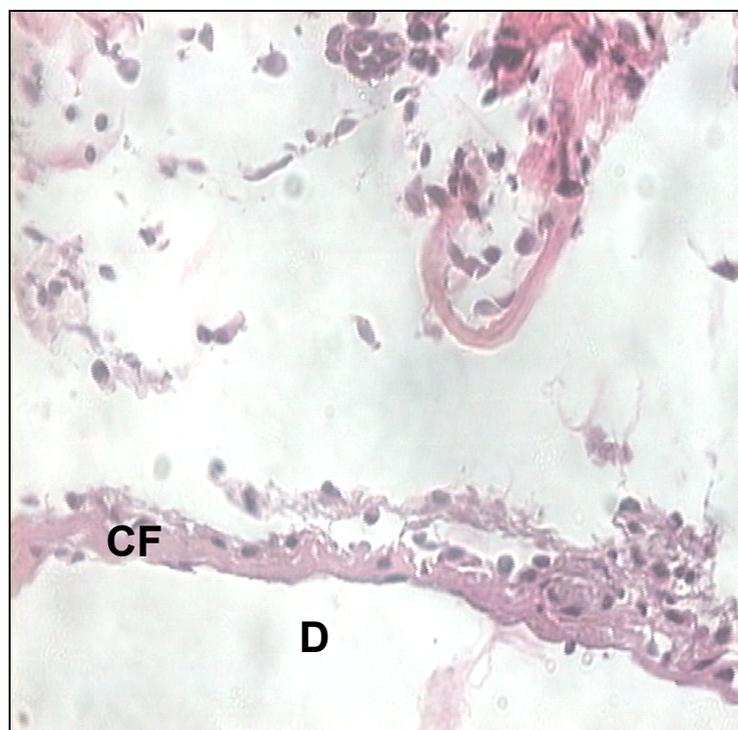


Figura 9 – LHA 3 dias 250x – Cápsula fibrosa (CF) envolvendo o material (D)

– 7 dias pós-operatórios:

Aos 7 dias, ocorre quadro inflamatório crônico (I) em contato com a superfície tratada com laser (SL). O aspecto é compatível com infiltrado linfo-plasmocitário e produz uma cápsula (CF) de espessura importante. (Fig. 10).

Junto à superfície tratada com HA, o envoltório fibroso (CF) é fino, bem definido e isento de reação inflamatória. A formação das fibras colágenas (FC) é bem disposta e linear (Fig. 11).

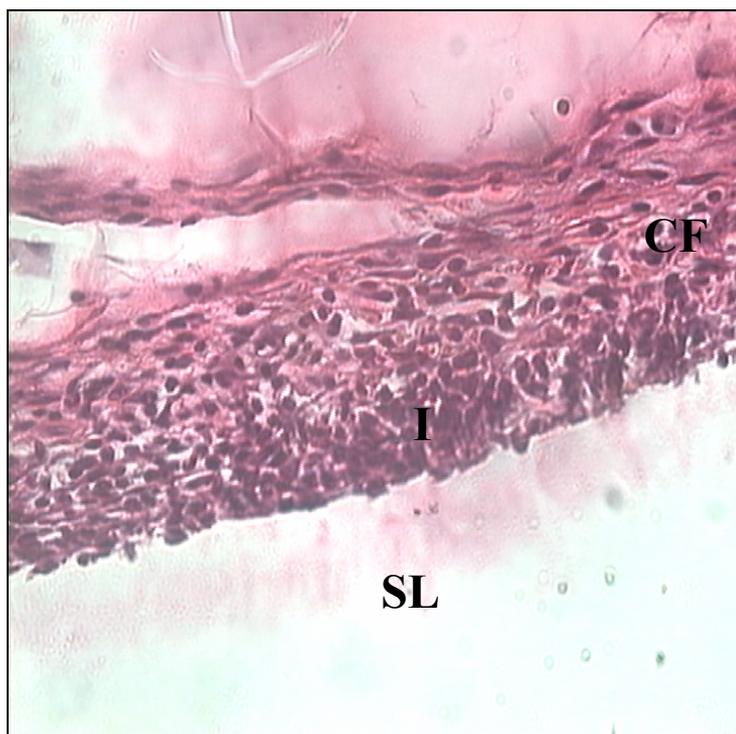


Figura 10 – LA 7 dias 250x – Infiltrado inflamatório (I) crônico junto ao material.

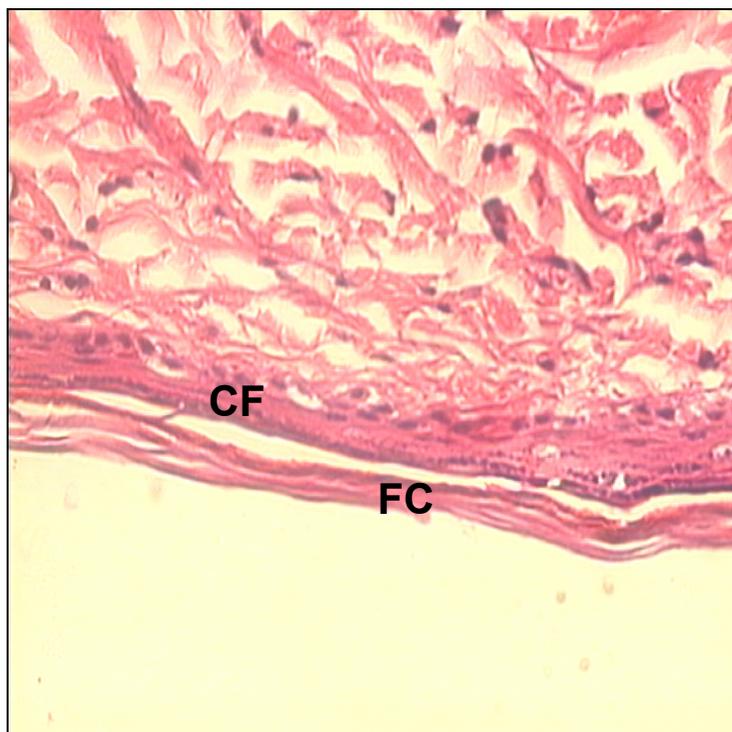


Figura 11 – LHA 7 dias 250x – Cápsula fibrosa (CF) com fibras colágenas bem dispostas. (FC)

– 14 dias pós-operatórios:

Aos 14 dias, o quadro tecidual em ambos os grupos é semelhante aos tempos iniciais. Do ponto de vista inflamatório, há regressão de presença de células inflamatórias no grupo LA, mas predomina uma cápsula fibrosa (CF) espessa, junto ao disco de titânio (D). (Fig. 12).

Raramente se verificou áreas inflamadas no grupo LHA, observamos uma cápsula fibrosa (CF) fina e bem definida. (Fig. 13).

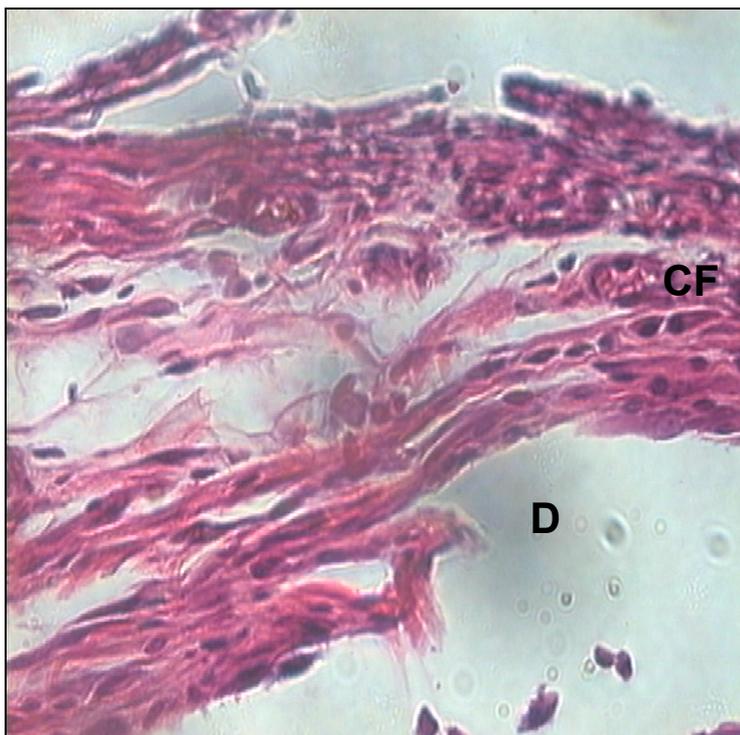


Figura 12 – LA 14 dias 250x – Tecido conjuntivo com células fibroblásticas em contato com o disco (D)

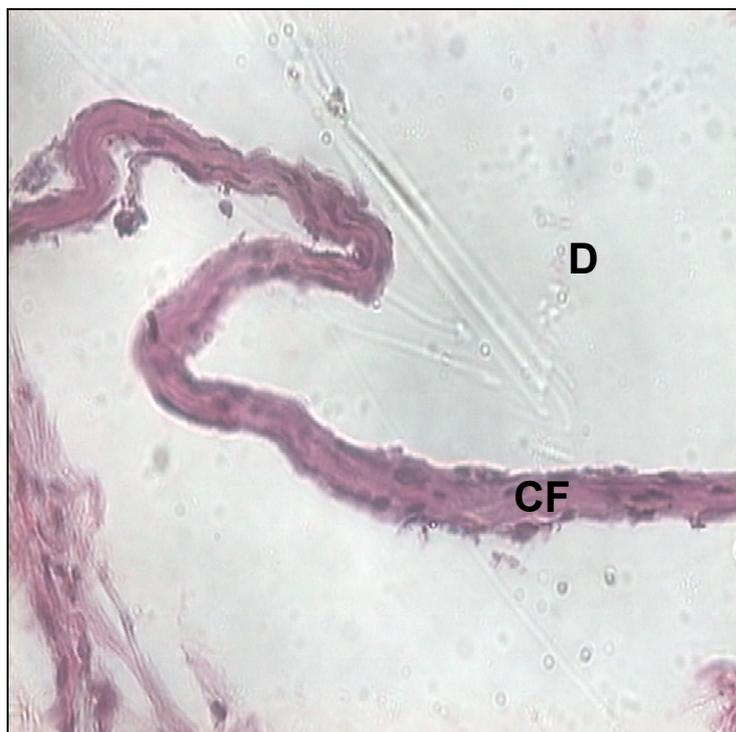


Figura 13 – LHA 14 dias 250x – Cápsula fibrosa (CF) envolvendo o disco (D)

– 21 dias pós-operatórios:

Aos 21 dias, o processo de encapsulamento está praticamente definido, com disposição linear das fibras colágenas junto aos discos. Os grupos, neste período, são semelhantes. A espessura da cápsula fibrosa (CF) é parecida e isenta de células inflamatórias. (Fig. 14 e 15).

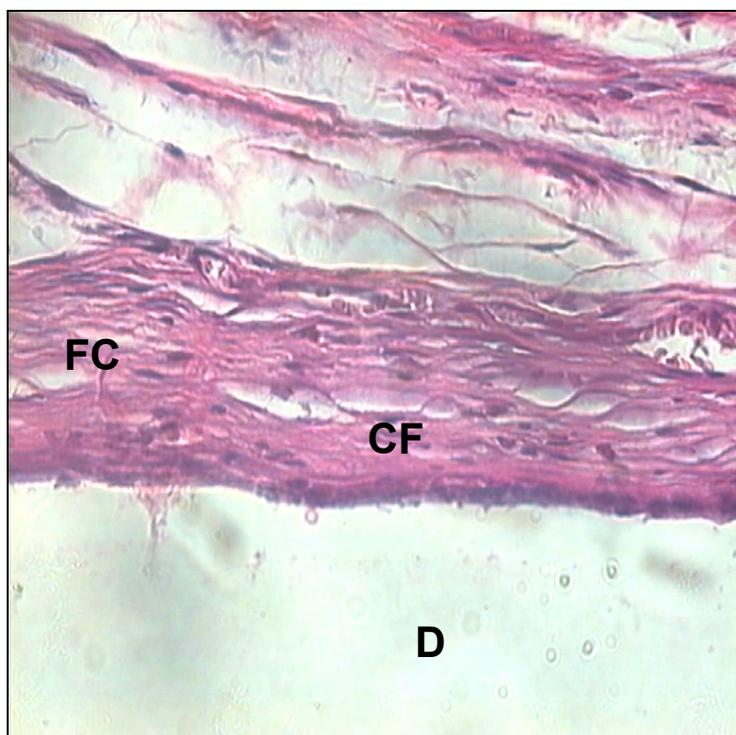


Figura 14 – LA 21 dias 250x – Tecido conjuntivo com fibras colágenas bem dispostas em contato com o material (D)



Figura 15 – LHA 21 dias 250x – Tecido conjuntivo (TC) denso junto ao disco (D)

4.1 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Foram obtidos os valores das espessuras do tecido conjuntivo (cápsula fibrosa) formado em contato com os discos de prova.

(Tabela 1)

Tabela 1 – Valores obtidos das mensurações das cápsulas fibrosas

Grupos	Valores da espessura das cápsulas fibrosas, em pixels.				
LA 3 dias	119,63	165,68	142,01	147,50	140,13
LA 7 dias	169,69	175,68	182,36	176,28	202,70
LA 14 dias	168,07	249,27	249,02	243,07	228,14
LA 21 dias	242,74	241,53	231,22	233,00	229,26
LHA 3 dias	49,34	32,76	62,07	42,19	84,01
LHA 7 dias	77,10	75,31	83,02	73,33	93,00
LHA 14 dias	36,40	47,38	51,09	41,11	35,01
LHA 21 dias	167,24	181,10	180,01	172,01	161,20

A partir desses valores foi executado o teste de Kruskal-Wallis para se comparar as medidas entre os grupos experimentais, obtendo-se o resultado de que havia diferença estatisticamente significativa para $\alpha > 0,01$.

O teste de Kruskal-Wallis é uma espécie de análise de variância a um critério de variação, para dados amostrais independentes. O teste não utiliza os valores numéricos diretamente, mas sim postos que eles ocupam numa série de dados ordenados por valores crescentes, série essa que reúne num só conjunto os dados de todas as amostras

que vão ser comparadas. Os dados são introduzidos amostra após amostra.¹¹

Tabela 2 – Resultado do teste de Kruskal-Wallis

Valor (H) de Kruskal-Wallis calculado:	20.1629
Valor do X ² para 1 grau de liberdade:	20.16
Probabilidade de Ho para esse valor:	0.00 %
Significante ao nível de 1 % (alfa = 0,01)	
O valor de H aparece repetido como X ² porque a sua significância é avaliada pela tabela do qui-quadrado.	

A probabilidade de Ho indica a probabilidade de se encontrar, por mero acaso, sem que de fato haja significância estatística real, o mesmo valor de H calculado pelo teste.

Tabela 3 – Comparação entre médias dos postos das amostras

Amostras comparadas (comparações duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos		(Ó)	Significância
		0,05	0,01		
LA X LHA:	16.6000	5.2713	7.0620	9.2921	0,1 %

5. DISCUSSÃO

A utilização dos implantes dentários osseointegráveis como forma de reabilitação teve grande evolução desde a sua descoberta. Os princípios e cuidados com a técnica operatória sofreram refinamentos, as indicações tornaram-se mais precisas e a previsibilidade aumentada.

Apesar da condição de osseointegração ser bem definida, muitas vezes, características individuais alteravam os índices de sucesso. Isto foi observado, por exemplo, em áreas de pobre qualidade e quantidade óssea e indicações de carga protética ou oclusal inapropriada. Uma tentativa de aumentar os índices de sucesso nestas condições é o tratamento dado às superfícies dos implantes, hoje amplamente pesquisada.

Neste estudo buscou-se observar a reação tecidual a dois tipos de tratamento dado a superfície de titânio. As características de rugosidade e descontaminação conseguida pelo uso do laser e, pelas propriedades específicas de ligação ao tecido ósseo da hidroxiapatita, espera-se que ocorra um bom desempenho quando utilizados na caracterização das superfícies dos implantes osseointegráveis, acelerando e melhorando a qualidade do processo de osseointegração.

Diferentemente de GÖTZ¹⁸ et al, que utilizaram superfícies alteradas pelo laser formando poros variando entre 50 a 300µm, este tipo de tratamento utilizado neste estudo provocou defeitos lineares com aproximadamente 25 a 30 µm de espessura, próximos às ranhuras geradas por GAGGL¹⁷ et al de 30 a 50µm.

Da mesma forma neste estudo, uma camada fina de HA de baixa cristalinidade, semelhante à HA biológica, foi encontrada nos discos depositada pelo mesmo método biomimético proposto por ABE¹ et al e RIGO²⁹ et al. Este depósito fino altamente denso e cristalino seria capaz de estabelecer uma forte ligação com a matriz óssea e ainda manter-se aderentes aos substratos.

Os resultados encontrados no estudo histológico demonstraram que o tratamento da superfície com a irradiação laser associado a HA do Ti cp não altera a biocompatibilidade do material, pela ausência de infiltrado inflamatório nos períodos finais.

As fibras colágenas do tecido conjuntivo mostraram-se nos períodos iniciais menos espessas no grupo LHA. Essas fibras apresentaram-se com orientação paralela a superfície dos discos formando uma cápsula fibrosa que envolvia toda a extensão dos corpos de prova.

O tecido conjuntivo formado ao redor das superfícies dos discos assemelhava-se muito ao descrito por BUSER¹⁰, “tecido composto por duas zonas distintas, uma mais próxima ao implante que se

caracterizava por possuir uma pequena espessura com arranjo de fibras colágenas circularmente dispostas, sem a presença de vasos sanguíneos, e outra mais externa se caracterizava por ser um tecido conjuntivo bem organizado, dominado por lâminas de fibras colágenas”.

É necessária a experimentação dessa topografia em implantes endósseos para a comprovação dos benefícios propostos por essa técnica.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo nos permite concluir:

- Houve formação conjuntiva na periferia das amostras de titânio, com espessura e presença celular semelhante, em ambos os grupos;
- Qualitativamente o grupo LHA mostrou melhor organização tecidual nos tempos iniciais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. Apatite coatings on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. *Journal of Science-Materials in Medicine*. V. 1, p. 536-40, 1990.
- 2 ALBREKTSSON, T. SENNERBY, L. Direct bone anchorage of oral implants: clinical and experimental considerations of the concept of osseointegration. *Int J Prosthodont*, V. 3, n. 1, p. 30-41, Jan/Feb. 1990.
- 3 BEREZNAI, M.; PELSOCI, I.; TOTH, Z.; TURZO, K.; RADNAI, M.; BOR, Z.; FAZEKAS, A. Surface modifications induced by ns and sub-ps excimer laser pulses on titanium implant material. *Biomaterials*. V. 24, n. 23, p. 197-203. Oct. 2003.
- 4 BERGMANN, H. W.; HARTMANN, M. Drilling of metals with copper vapour lasers. In: MAZUMDER, J.; MUKHERJEE, K. Editors. *Laser materials processing IV*. Warrendale, PA: The Minerals, Metals & Materials Society. p. 33-44. 1994.
- 5 BLIND, O.; KLEIN, L. H.; DAILEY, B.; JORDAN, L. Characterization of hydroxyapatite films obtained by pulsed-laser deposition on Ti and Ti-6AL-4v substrates. *Dental Materials*. V. 20, p. 1-8, 2005.

- 6 BRABER, E. T. et al., Effect of parallel surface microgrooves and surface energy on cell growth. *J Biomed Mater. Res.* V. 29, n. 4, p. 511-18, April, 1995.
- 7 BRÅNEMARK, P. I. et al. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg.* V. 3, p. 81-100, 1969.
- 8 BRUNETTE, D. M., Spreading and Orientation of Epithelial Cells on Grooved Substrata. *Exp Cell Res.* V. 167, p. 203-17, 1986.
- 9 BRUNETTE, D. M. The effects of implant surface topography on the behavior of cell. *Int J Maxillofac Impl.* V. 3, n. 4, p. 231-46, Winter, 1988.
- 10 BUSER, D. Soft tissue reactions to non-submerged unloaded titanium implants in beagle dogs. *J Periodontol.* V. 63, n. 3, p. 225-35, Mar., 1992.
- 11 CAMPOS, G. M. Programa GMC (Pesquisa biológica) Versão 2002. Ribeirão Preto, SP. 2002.
- 12 CORTEZ, A. L. V. Influência de diferentes superfícies de implantes endósseos de titânio sobre o processo de osseointegração. Análises histológica e histométrica em tíbia de coelhos. Piracicaba, 2002, 90f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
- 13 CLÈRIES, L.; FERNANDEZ-PRADAS, J. M.; MORENZA, J. L. Bone growth on and resorption of calcium phosphate coatings obtained

- by pulsed laser deposition. *J Biomed Mater Res.* V. 49, p. 43–52, 2000.
- 14 COCHRAN, D. L. et al. Attachment and growth of periodontal cells on smooth and rough titanium, *Int J Oral Maxillofac Implant.* V. 9, n. 3, p. 289-97, Mar., 1994.
 - 15 DEPORTER, D. A. et al. Histological evaluation of a functional endosseous, porous-surfaced, titanium alloy dental implant system in the dog. *J Dent Res.* V. 67, n. 9, p. 1190-95, Sep., 1988.
 - 16 DUCHEYNE, P.; RAEMDONCK, W. V.; HEUGHEBAERT, J. C.; HEUGHEBAERT, M. Structural analysis of hydroxyapatite coating on titanium. *Biomaterials.* V. 7, p. 97-103, 1986.
 - 17 GAGGL A, SCHULTES G, MULLER WD, KARCHER H. Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces – a comparative study. *Biomaterials.* V. 21, n. 10, p. 1067-73. May, 2000.
 - 18 GÖTZ, H. E. et al. Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. *Biomaterials.* V. 25, p. 4057-64, 2004.
 - 19 HULBERT, S.F.; YOUNG, F.A.; MATHEWS, R.S.; KLAWITTER, J.J.; TALBERT, C.D.; STELLING, F.H. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res.* V. 4, p. 433-56, 1970.

- 20 KIESWETTER, K. et al. The role of implant surface characteristics in the healing of bone, *Crit Ver Oral Biol Med*. V. 7, n. 4, p. 329-345, 1996.
- 21 KIPALDI, D. V.; LEMONS, J. E. Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. *J Biomed Mater Res*. V. 28, n. 12, p. 1419-25, Dec., 1994.
- 22 LI, J.; LIAO, H.; FARTASH, B.; HERMANSSON, L.; JOHNSON, T. Surface-dimpled commercially pure titanium implant and bone ingrowth. *Biomaterials*. V. 18, p. 691-6, 1997.
- 23 MAREK, B.; WAGNER, W. R.; CHOU, L., Effects of HA coating crystallinity on biosolubility, cell attachment efficiency and proliferation in vitro. *J Dent Res*. V. 77, Special Issue B, p.967, June, 1998.
- 24 McPHERSON, R.; GANE, N.; BASTOW, T. J. Structural characterization of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings. *J Mater Sci Mater Med*. V. 6, p. 327-34. 1995
- 25 ONG, J. L. et al. Effect of surface topography of titanium on surface chemistry and cellular response. *Impl Dent*. V. 5, n. 2, p. 83-8, Summer, 1996.
- 26 POSER, R. D.; MAGEE, F.P.; KAY, J. F.; HEDLEY, A. K. In vivo characterization of hydroxyapatite coatings. In: Birmingham AL, editor. In: Transactions of the 16th Annual Meeting of the Society for Biomaterials. V. 13, p. 170, 1990.

- 27 RATNER, B. D. New ideas in biomaterial science: a path to engineered biomaterials. *J Biomed Mater Res.* V. 27, p. 837-50, 1993.
- 28 RESENDE, D. R. B. Avaliação da reação tecidual ao redor de diferentes topografias superficiais de protótipos de Ti cp implantados no subcutâneo de ratos. Dissertação (Mestrado), Bauru, 1999, 127p. Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru.
- 29 RIGO, E. C. S.; OLIVEIRA, L. C. SANTOS, L. A. CARRODEGUAS, R. G. E.; BOSCHI, A. O. Biomimetic method for obtaining hydroxyapatite. *Materials Science Forum.* P. 299-300, 1999.
- 30 SCHROEDER, A. et al. Ober die Anlagerung von Osteozeiment an einen belasteten implantat korper. *Schweriz Mschr Zahnheilk.* V. 88, p. 1051-8, 1978.
- 31 SISTI, K. E. Análise da superfície de titânio sob ação do laser com e sem deposição de hidroxiapatita. Dissertação (Mestrado). 2004, 74f. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba.
- 32 STEINEMANN, S. G. et al. Adhesion of bone titanium. *Advanc Biomat.* V. 6, p. 409-14, 1982.
- 33 THOMAS, K. A.; COOK, S. D. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J Biomed Mater Res.* V. 19, n. 8, p. 875-901, 1985.

- 34 TONG, W.; YANG, Z.; ZHANG, X.; FENG, J.; CAO, Y.; CHEN, J.
Studies on diffusion maximum in X-ray diffraction patterns of
plasma sprayed hydroxyapatite coatings. J Biomed Mat Res. V.
40, p. 407-13, 1998.
- 35 WATSON, C. J.; OGDEN, A. R.; TINSLEY, D.; RUSSEL, J. L.;
DAVIDSON, E. M. A 3- to 6-year study of overdenture supported
by hydroxyapatite-coated endosseous dental implants. Int J
Prosthodontics. V. 11, p. 610-9, 1998.

Abstract

LACOSKI MK. Tissue reaction to the titanium surface treated with laser irradiation and hydroxyapatite: Histomorphometric analysis in rats. Araçatuba, 2006. 50p. Thesis (Master's Degree in Oral Maxillofacial Surgery and Traumatology) – Dental School, Paulista State University.

The treatment of surface of the dental implants is consolidated as a method capable to speed up and to improve the quality of the osseointegration, making possible precocious shipment techniques of the implantations, decreasing the time of treatment and the number of failures. Of this form, the aim of this study was to observe the cellular behavior of the subcutaneous tissue submitted to titanium implantations treated with laser and laser with hydroxyapatite. For this, 32 test implants of grade-I commercially pure titanium had been inserted in the connective tissue of the dorsal region of 16 male rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), divided in 2 groups: LA – test implants treated with laser irradiation and LHA – test implants treated with laser irradiation and deposition of hydroxyapatite by the biomimetic method. In the histological analysis it could be observed that it had conjunctive formation in the periphery of the titanium samples, with thickness and similar cellular presence, in both groups. Qualitatively, the group LHA better showed tissue organization in the initial times. There was statistic significant difference between the groups, of the measure of the thickness of the

fibrous connective tissue formed in contact with tested implants, for $\alpha > 0,01$.

Keywords: Dental implantation. Laser. Hydroxyapatite.

ANEXOS

Tabela 4 – Valores das médias das espessuras das cápsulas fibrosas em contato com os discos de prova, em pixels.

Grupos	Períodos			
	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias
LA	142,99	181,34	227,51	235,55
LHA	54,07	80,35	42,19	172,31

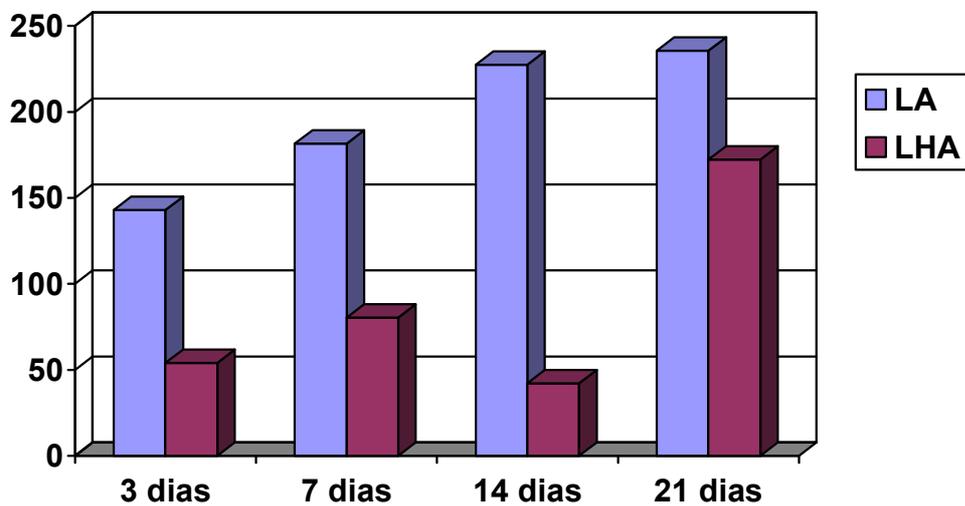


Gráfico 1 – Média das espessuras das cápsulas fibrosa (em pixels) em contato com os discos de prova



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "REAÇÃO TECIDUAL À SUPERFÍCIE DE TITÂNIO TRATADA PELA IRRADIAÇÃO LASER E HIDROXIAPATITA: ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA EM RATOS" sob responsabilidade de IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR, MARCELO KAYATT LACOSKI, LEANDRO CARVALHO CARDOSO e FERNANDO ESGAIB KAYATT está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em reunião ordinária de 18 de outubro de 2005, de acordo com o protocolo nº 125/05.

Araçatuba, 18 de outubro de 2005.


Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente