

Estudo Comparativo da Biocompatibilidade de Implantes de Titânio e Titânio Revestido de Hidroxiapatita em Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)¹

Comparative Study of Biocompatibility of Pure Titanium and Hydroxyapatite Coated Implants in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)

Marcelo Yoshimoto*
Bruno König Junior**
Sérgio Allegrini Junior***
Marcelo José Carbonari****

Claudia de Carvalho Lopes***
Nelson Adami Junior*****
Marcos Barbosa Salles*****

Yoshimoto M, König Jr B, Allegrini Jr S, Carbonari MJ, Lopes C de C, Adami Jr N, Salles MB. Estudo comparativo da biocompatibilidade de implantes de titânio e titânio revestido de hidroxiapatita em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Rev Bras Implantodont Prótese Implant 2004; 11(42):143-7.

Neste trabalho, procuramos traçar um estudo comparativo entre duas superfícies de implantes osteointegráveis disponíveis no mercado, a saber: titânio puro (Ti) e titânio revestido de hidroxiapatita (HA). Para este estudo, utilizou-se o coelho como modelo animal (*Oryctolagus cuniculus*), no qual a porção proximal da tíbia foi utilizada como leito receptor dos implantes, aguardando um período de cicatrização de oito semanas. As amostras obtidas foram avaliadas sob microscopia de luz, luz ultravioleta e fluorescência. Marcadores ósseos foram aplicados para avaliar neoformação óssea através da histomorfometria, utilizando-se para análise o sistema CAST (*Computer Assisted Stereological Toolbox*) por intermédio do programa GRID. Os resultados demonstraram uma biocompatibilidade satisfatória de ambas as superfícies dos implantes, sem reação inflamatória, com a presença de um tecido osteóide ao redor da superfície do implante, com uma notável interação entre o osso e os implantes revestidos de hidroxiapatita. Concluímos que, embora ambas as superfícies estudadas tenham apresentado boa interação com o tecido ósseo, os implantes com revestimento de hidroxiapatita apresentaram, qualitativamente, uma melhor integração quando comparados com os implantes de dióxido de titânio.

PALAVRAS-CHAVE: Implantes dentais; Titânio; Hidroxiapatita; Marcadores ósseos; Microscopia de luz.

INTRODUÇÃO

Com o advento da osteointegração, ficou comprovada a eficácia dos implantes dentais para reabilitação oral (Brånemark *et al.*, 1969; Albrektsson, Sennerby 1990; Buser *et al.*, 1994; Spiekermann *et al.*, 1994; Wie *et al.*, 1998), consagrando o titânio puro (Ti) como um material biocompatível que leva à osteointegração. Entretanto, as pesquisas e a busca de novos materiais que pudessem apresentar uma melhor interação biológica levaram à

criação de outros conceitos, dadas as características e respostas biológicas apresentadas. Nos tempos atuais, os conceitos de biocompatibilidade relacionados com a osteointegração podem ser classificados como: materiais biotoleráveis (CrCoMo), bioinertes (Ti, Al₂O₃, Ti6Al4V), biorreativos (biovidros, HA) (Spiekermann *et al.*, 1994). Estes conceitos ampliam o primeiro conceito no que tange a uma melhor interação entre os materiais e o tecido ósseo.

As grandes companhias de fabricantes de implantes dentais, sempre em busca de novos materiais e visando a uma

¹ Tese de Mestrado em Ciências defendida no Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

* Aluno de Doutorado do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; Mestre em Ciências; Especialista em Implantodontia; Av. Alberto de Faria Cardoso, 11, Jd. Bonfiglioli - CEP 05363-120, São Paulo, SP; e-mail: myoshi@osite.com.br

** Professor Titular do Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

*** Aluno de Doutorado do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; Mestre em Ciências; Especialista em Implantodontia

**** Aluno de Doutorado do Instituto de Pesquisa em Energia Nuclear; Mestre em Ciências

***** Aluno de Doutorado do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; Mestre em Ciências; Especialista em Periodontia

***** Mestre em Ciências

resposta cicatricial mais rápida, começaram a estudar outros materiais para atingir tal meta. Em meados da década de 80, alguns autores começaram a estudar o revestimento de hidroxiapatita para implantes dentais com vantagens sobre os implantes de titânio puro (Golec, Krauser 1992; Morris, Ochi, 1998). Entretanto, esse material foi criticado por outros como Albrektsson, Sennerby, 1990; Buser *et al.*, 1994; Ericsson *et al.*, 1994; Wie *et al.*, 1998, que demonstraram que a adesão entre a Ha e os implantes é mais fraca se comparada à interação entre o tecido ósseo e a HA. Estes resultados foram, no entanto, contestados pelas pesquisas de Kay, 1993; Block, 1993; Lozada, 1993; Yukna, 1993.

Este trabalho visa a comparar, através do teste de biocompatibilidade, em modelo animal, implantes de titânio puro e implantes com superfície de revestimento de hidroxiapatita, inseridos em tibia de coelhos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA), tendo recebido certificado nº93/99.

Para esta pesquisa, os resultados foram obtidos através de microscopia de luz, fluorescência e ultravioleta. Para a fluorescência, foram utilizados marcadores ósseos para se verificar diferentes períodos de deposição de tecido ósseo neoformado (König *et al.*, 1998; Lopes, 1999).

Os nichos cirúrgicos foram realizados na porção proximal da tibia de oito coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), machos, com um ano de idade, pesando aproximadamente 3Kg, utilizando brocas seqüenciais de 2,0 a 3,0mm, usando irrigação externa através de solução salina. Todos os passos do protocolo cirúrgico para se obter a osteointegração foram

seguidos. Dezesesseis implantes de titânio puro, medindo 3,50mm x 10,00mm, foram instalados nas tíbias direitas, e outros 16 implantes de revestimento de hidroxiapatita foram inseridos nas tíbias esquerdas, perfazendo um total de 32 implantes, dois implantes por tibia.

O período de cicatrização foi de oito semanas, dada a velocidade do metabolismo animal ser cerca de três vezes mais rápida do que nos humanos (Roberts *et al.*, 1993). Durante tal período, marcadores de polifluorcromo foram aplicados subcutaneamente, de acordo com a Tabela 1, para se verificar os períodos de deposição dos marcadores no tecido ósseo, verificando, dessa forma, a neoformação óssea ao redor dos implantes.

As amostras foram então processadas para avaliação histológica e foram coradas pelo Tricrômio de Masson.

A avaliação estereológica para obtenção de dados quantitativos de formação óssea foi realizada através do CAST system (Computer Assisted Stereological Toolbox) e o GRID program.

RESULTADOS

Após um período de oito semanas de cicatrização e reparação óssea, clinicamente não foi verificado nenhum sinal de infecção e/ou inflamação em nenhuma das duas superfícies estudadas. Na avaliação em microscopia de luz, verificamos uma boa biocompatibilidade de ambos os materiais, porém, de acordo com a avaliação histomorfométrica (Tabela 2), constatamos uma melhor interação do tecido ósseo em relação à superfície dos implantes naqueles revestidos de hidroxiapatita. Áreas de remodelação óssea foram observadas ao longo dos corpos dos implantes de ambas as amostras (Figuras 1 e 2), evidenciadas por migração óssea advinda da cortical em direção à superfície das amostras, preenchendo as espiras dos implantes de hidroxiapatita e de titânio puro.

TABELA 1: Seqüência de marcadores ósseos.

Tempo	Substância	Doses	Aplicações (mg/kg)
14 dias	Alizarina (C14H8O4)	30	3g/100ml + 2g Na2HPO4
21 dias	Alizarina (C14H8O4)	30	3g/100ml + 2g Na2HPO4
28 dias	Calceína (C30H26N4O13)	10	1g/100ml + 2g Na2HPO4
35 dias	Calceína (C30H26N4O13)	10	1g/100ml + 2g Na2HPO4
42 dias	Tetraciclina	60	6g/100ml
49 dias	Tetraciclina	60	6g/100ml
56 dias	Sacrifício		

TABELA 2: Tabela de neoformação óssea (%).

Áreas de formação óssea	Titânio puro	Hidroxiapatita
Área compacta	26,93%	27,38%
Área esponjosa	39,59%	48,75%
Área não-significante	0,86%	1,13%
Área osteóide	35,37%	22,76%

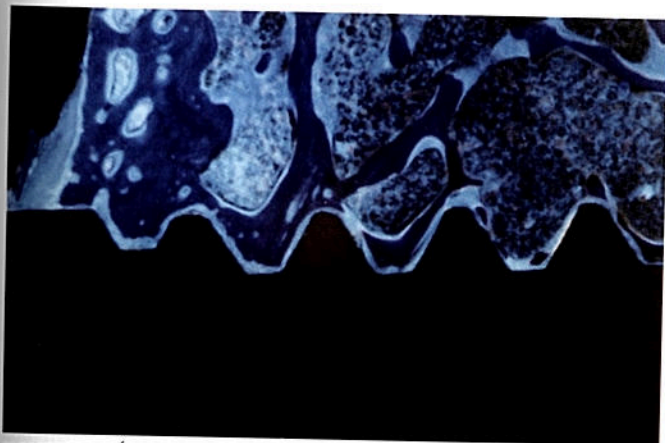


FIGURA 1: Áreas de remodelamento ósseo observadas ao redor do corpo do implante de dióxido de titânio, evidenciadas por migração óssea preenchendo as espiras dos implantes, apresentando, no entanto, uma pequena linha entre o osso e a superfície do implante. Microscópio de luz ultravioleta com magnificação de 30x do original.

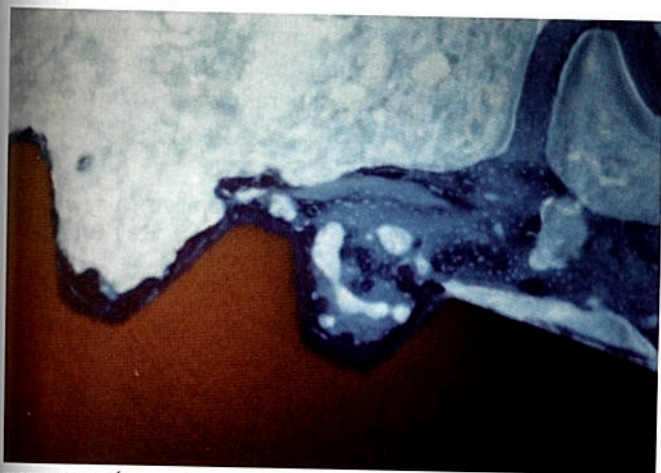


FIGURA 2: Áreas de remodelamento ósseo observadas ao redor do corpo do implante de revestimento de hidroxiapatita, evidenciadas por migração óssea preenchendo as espiras dos implantes com um contato direto do tecido ósseo com a superfície do implante. A camada de revestimento apresenta uma coloração azul mais intensa. Microscópio de luz ultravioleta com magnificação de 50x no original.

Além da análise histomorfométrica, reforçando os resultados obtidos, observamos, histologicamente, um contato direto do tecido ósseo na superfície revestida de Ha, sendo que nas amostras de Ti verificamos a presença de um espaço entre o osso e a superfície do implante, demonstrando de fato uma melhor interação nos implantes de hidroxiapatita.

A neoformação óssea ficou evidente pela presença de "pontes" ósseas migrando do osso cortical em direção à superfície de ambas as superfícies dos implantes através do espaço medular (Figuras 3 e 4). Os marcadores ósseos demonstraram com eficiência diferentes períodos de formação óssea (Figura 5), evidenciados por uma coloração cor de "tijolo" para alizarina; verde para calceína e alaranjado para a tetraciclina.

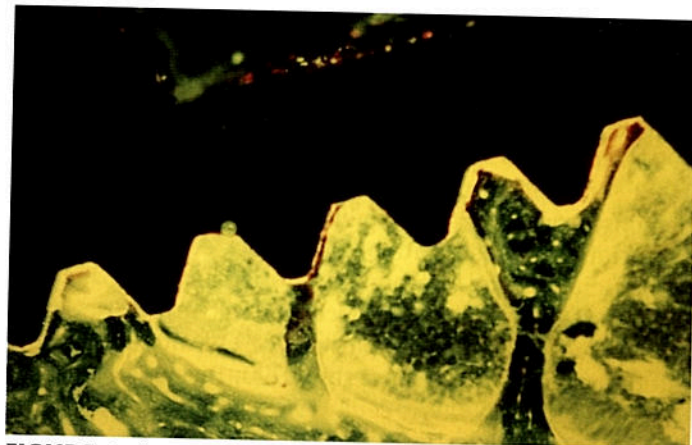


FIGURA 3: Osso neoformado evidenciado pela presença de "pontes" ósseas, migrando do osso cortical em direção à superfície de titânio puro através do espaço medular. Microscopia de fluorescência com aumento de 50x no original.



FIGURA 4: Neoformação óssea foi evidenciada pela presença de "pontes" ósseas, migrando do osso cortical em direção à superfície de revestimento de hidroxiapatita através do espaço medular. Tricromo de Masson, aumento de 30x no original.

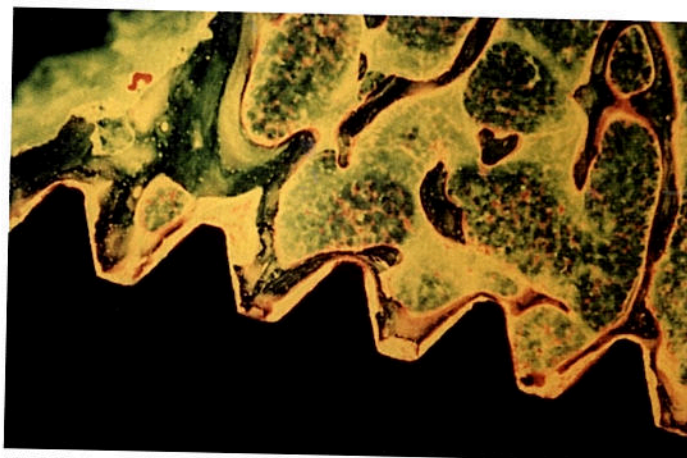


FIGURA 5: Marcadores ósseos demonstrando diferentes períodos de formação óssea. Cor de "tijolo" para alizarina, verde para calceína, e amarelo para tetraciclina. Microscopia de fluorescência com aumento de 50x no original.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste estudo vão de acordo com os apresentados por Kent *et al.*, 1990; Buser *et al.*, 1991; Meffert, 1993; Block, 1993; Yukna, 1993; Morris, Ochi 1998, em que implantes revestidos de hidroxiapatita demonstraram resultado qualitativamente melhor entre os materiais aqui estudados. Materiais com rugosidade superficial maior também demonstram uma melhor integração, como a verificada em implantes com revestimento de hidroxiapatita. No entanto, há outros estudos (Albrektsson, Sennerby, 1990; Buser *et al.*, 1994; Ericsson *et al.*, 1994; Wie *et al.*, 1998) demonstrando que a adesão entre o revestimento de hidroxiapatita e o núcleo metálico é mecanicamente mais fraca quando comparada com a adesão entre o revestimento e o tecido ósseo. Neste trabalho, entretanto, não foi possível checar tais assertivas, pois os achados foram baseados em um período de cicatrização de oito semanas e os implantes não foram colocados em função.

A título de ilustração somente, em apenas uma amostra, verificou-se um descolamento entre o núcleo metálico do implante e seu revestimento de hidroxiapatita. Mas, por se tratar de apenas uma amostra, não constituiu um universo amostral digno de nota, merecendo apenas uma referência,

com a ressalva de não se saber determinar se tal fato ocorreu durante o preparo do material ou se realmente foi um problema de adesão do revestimento em relação ao núcleo metálico no processo de revestimento propriamente dito.

Muitos trabalhos mostram uma melhor reação entre o tecido ósseo e os implantes quando a superfície tem uma superfície rugosa obtida por qualquer tratamento de superfície, mas aqueles implantes com revestimento de hidroxiapatita, segundo Ericsson *et al.*, 1994; Caulier *et al.*, 1997, em longo prazo de observação, não são previsíveis. Os resultados aqui apresentados, quando comparados com resultados de outros autores, como Sennerby *et al.*, 1993; Spiekermann, 1994; Wie *et al.*, 1998; Morris, Ochi, 1998, mostram que ambos os materiais apresentam boa biocompatibilidade, mas a hidroxiapatita, na presente pesquisa, parece acelerar o processo de osteointegração.

CONCLUSÃO

Através deste trabalho, foi possível concluir que, embora ambas as superfícies estudadas tenham apresentado boa interação com o tecido ósseo, os implantes com revestimento de hidroxiapatita apresentaram qualitativamente uma melhor integração quando comparados com os implantes de dióxido de titânio.

Yoshimoto M, König Jr B, Allegrini Jr S, Carbonari MJ, Lopes C de C, Adami Jr N, Salles MB. Comparative study of biocompatibility of pure titanium and hydroxyapatite coated implants in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Rev Bras Implantodontol Prótese Implant 2004; 11(42):143-7.

The aim of this work is to establish a histological comparison between two different osteointegrated implant surfaces: smooth titanium and hydroxyapatite coated titanium. The proximal portion of rabbits' tibias was used as implant beds, with a healing period of eight weeks. The obtained samples were analyzed by light, ultra-violet and fluorescence microscopes and treated with bone tracers to evaluate bone tissue neof ormation. The stereological analysis was performed by CAST system (Computer Assisted Stereological Toolbox), using a GRID program. Light microscopic evaluation, performed after a period of eight weeks, presented a satisfactory biocompatibility of the implants, with no inflammatory reaction and with the presence of osteoid tissue around the implant surface with a notorious interaction between bone and HA coated implants. Qualitatively, hydroxyapatite coated titanium implants present a prominent integration when compared to the titanium dioxide ones.

KEYWORDS: Dental Implants; Titanium; Hydroxyapatite; Tri-calcium Phosphate; Tissue Markers; Light microscopy.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de expressar nossa gratidão ao sistema de implantes INTRA-LOCK® e em especial ao Prof. Dr. Aziz Constantino, pelo apoio e pela doação do material que tornou esta pesquisa possível.

Agradecimentos especiais ao Laboratório de Neuroanatomia

e ao Laboratório de Histologia do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e aos Técnicos: Marta Maria da Silva Righetti, Maria do Socorro Pereira Abel, Nilson Silva Souza, Sebastião Aparecido Boleta e Wilson Roberto Campos de Azevedo.

REFERÊNCIAS

Albrektsson T, Sennerby L. Direct bone anchorage of oral implants: clinical and experimental considerations to the concept of osseous integration. Int J Prosthodont 1990; 3:30-41.
Block MS. Cylindrical HA-coated implants - 8 year observations. Compend Contin Educ Dent Suppl 1993; 15:526-32.

Brånemark PI, Breine U, Adell R, Hansson BO, Indström J, Olsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. Scand J Plast Reconstr Surg 1969; 3:81-100.
Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium

implant
Mater
Buser D
Dentist
Caulier
JA. A
applica
implant
Mater
Ericsson
phome
prepare
the do
Golec
hydrox
Dental
Kay JF.
and bic
1993;
Kent JI
Biointe
clinical
König E
differer
insertio
180:4;
Lopes
integra

orreu
i um
úcleo
to.
tre o
uma
o de
to de
et al.,
íveis.
; com
1993;
1998,
boa
sente
ão.

nbor
o boa
nento
uma
tes de

implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1991; 25:889-902.
 Buser D, Dahlin C, Schenk RK. Guided bone regeneration in Implant Dentistry. [S.l.]: Quintessence Publishing; 1994.
 Caulier H, Van-Der-Waerden JP, Wolke JG, Kalk W, Naert I, Jansen JA. A histological and histomorphometrical evaluation of the application of screw-designed calcium phosphate (Ca-P) coated implants in the cancellous maxillary bone of the goat. *J Biomed Mater Res* 1997; 35:19-30.
 Ericsson I, Johansson CB, Bystedt H, Norton MR. A histomorphometric evaluation of bone to implant contact on machine-prepared and roughened titanium dental implants. A pilot study in the dog. *Clin Oral Implant Res* 1994; 5:202-6.
 Gölec TS, Krauser JT. Long-term retrospective studies on hydroxyapatite-coated endosteal and subperiosteal implants. *Dental Clin North Am* 1992; 36:39-65.
 Kay JF. Calcium phosphate coatings: understanding the chemistry and biology and their effective use. *Compend Contin Educ Dent* 1993; 15:520-5 (Suppl.).
 Kent JN, Block MS, Finger IM, Guerra L, Larsen H, Misiek DJ. Biointegrated hydroxylapatite-coated dental implants: 5-year clinical observations. *J Am Dent Assoc* 1990; 121:138-44.
 König BJ, Beck TJ, Kappert HF, Kappert CC, Masuko TS. A study of different calcification areas in newly formed bone 8 weeks after insertion of dental implants in rabbit tibias. *Ann Anat* 1998; 180:471-5.
 Lopes CC. A structural and ultrastructural study of osseous integrated implants used in Dentistry, Lifecore System [Thesis

presented for Master degree]. São Paulo: University, Brazil - Biomedical Sciences Institute, Department of Functional Anatomy Structure and Ultrastructure; 1999
 Lozada JL. HA-coated implants: warranted or not? *Compend Contin Educ Dent* 1993; 15:539-43.
 Meffert RM. Maxilla vs. mandible - why use HA? *Compend. Contin Educ Dent Suppl* 1993; 15:533-8.
 Morris HF, Ochi S. Hydroxyapatite - coated implants: A case for their use. *J Oral Maxillofac Surg* 1998; 56:1303-11.
 Roberts E, Garetto L, Breznjak N. Bone physiology and metabolism. In: MISCH, C. Contemporary Implant Dentistry. St. Louis: Mosby Year Book; 1993. p.327-68.
 Sennerby L, Thomsen P, Ericsson LE. Early tissue response to titanium implants inserted in rabbit cortical bone. Part I light microscopic observations. *J Mater Sci Mater Med* 1993; 4:240-50.
 Spiekermann H. Farbatlanten der Zahnmedizin: Implantologie. Thieme, Stuttgart - New York; 1994.
 Wie H, Hero H, Solheim T. Hot isostatic pressing-processed hydroxyapatite-coated titanium implants: light microscopic and scanning electron microscopy investigations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; 13:837-44.
 Yukna RA. Optimizing clinical success with implants maintenance and care. *Compend Contin Educ Dent* 1993; 15: 554-64 (Suppl).

Recebido para publicação em: 28/05/03
 Enviado para análise em: 24/06/03
 Aceito para publicação em: 21/07/03

tomia
le São
ria do
recido

Olsson
nental

ich H.
anium