

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMPLANTODONTIA**

Ernesto Barquero Cordero

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO ÓSSEA EM IMPLANTES
USINADOS DE TITÂNIO ESTIMULADOS ELETRICAMENTE:
ESTUDO EM CÃES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Martin

Florianópolis
2012

Ernesto Barquero Cordero

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO ÓSSEA EM IMPLANTES
USINADOS DE TITÂNIO ESTIMULADOS ELETRICAMENTE:
ESTUDO EM CÃES**

Esta Tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração: Implantodontia, e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 21 de maio de 2012.

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Geninho Thomé

Prof. Dr. Carlos Nelson Elias

Prof. Dr. Waldemar Daut Polido

Prof. Dr. Cesar Augusto Magalhães Benfatti

A **Deus**, que me deu amor e forças em todo esse tempo, me segurou com sua mão e me mostrou o maravilhoso que é viajar ao lado dele.

À minha esposa e ao meu filho, **Samantha** e **José Lucas**, meus amores e pilares fundamentais – sem vocês minha vida não teria a mesma felicidade e o significado que ela tem.

Aos meus avós, **Jose Luis**, **Luz** e **Rosa** – mesmo sem estudos, vocês me ensinaram o valor da escola e que a luta e a coragem são determinantes para o sucesso.

Aos **meus pais**, **irmãos** e **irmãs**, especialmente ao meu irmão **Luis Carlos** (*in memoriam*), que foram a parte mais sacrificada ao longo destes anos – sem os seus ensinamentos na educação, porém, e sem os valores ensinados, eu jamais teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, por me receber como aluno nesta respeitada instituição, em especial ao CEPID. Por todo o tempo me senti como se estivesse em minha própria casa.

Ao professor Ricardo de Souza Magini. Com ele aprendi que os sonhos podem tornar-se realidade, que a espiritualidade e a pesquisa podem se unir e conseguir grandes coisas. Mais que um professor, um mestre.

Ao professor Marco Aurélio Bianchini. Obrigado por ensinar-me a correr atrás das coisas, a trazer as soluções e não os problemas.

Ao professor Antonio Carlos Cardoso, por ensinar-me senso crítico.

Às funcionárias do CEPID, Gisela, Miriam e Nilcéia. Sem vocês o CEPID não funcionaria da mesma forma. Obrigado pela dedicação e paciência.

Ao Batista e ao Sergio. Mais do que funcionários: construímos uma amizade. Sem a sua ajuda, este tempo jamais seria igual.

Aos demais funcionários da faculdade, pela dedicação e colaboração em todos os momentos.

Aos meus parceiros e amigos, Armando, Gustavo Sella, Rodrigo, André, João Gustavo, Clessius, Rafaella, Isis, Maria, Ivan, Carol, Newton, José Moisés, João Rodrigo, Aline, Cleide, Dingo. Ao longo deste tempo exercitamos companheirismo, compreensão e, com certeza, a amizade que prevalecerá pela vida inteira.

Aos estagiários Haline, João e Fernanda, pela colaboração imprescindível.

À professora Mabel Cordeiro, sem dúvida alguma uma das melhores professoras que passou pela minha vida.

Ao meu coorientador, Carlos Alberto Martin, e ao aluno Ricardo de Araujo Elias, amigos. Obrigado por terem trabalhado e abraçado o sonho de um "implante elétrico".

Uma atenção especial ao Armando, pela parceria durante todo o doutorado. Você sabe quanto difícil foi a tarefa. Sem a sua ajuda eu não o teria finalizado. Com certeza seu trabalho e sua dedicação serão reconhecidos pelo Brasil.

À Marcilani, minha mãe brasileira. Obrigado por dar-me o amor de mãe, por corrigir-me com paciência e ajudar-me quando eu mais precisava. Deus coloca anjos na nossa vida. Você foi um deles.

À Gláucia, um presente de Deus, uma irmã brasileira que abriu as portas do seu coração com tanto carinho. Sem você eu não teria alcançado os meus objetivos.

Aos meus irmãos brasileiros. Ao César, companheiro de tanta parceria ao longo destes anos, uma pessoa que admiro e de quem gosto muito, como se fosse um verdadeiro irmão de sangue. Muito obrigado por acreditar em mim, por ensinar-me o caminho da implantodontia, da pesquisa, e por presentear-me com uma frase: "O futuro pertence a você, você é quem traça o seu próprio caminho". Sem sua parceria jamais seria a pessoa que sou hoje. Ao China, parceiro total. Admiro sua coragem e o seu trabalho. Em seu vocabulário não existe a palavra preguiça. Obrigado por ensinar-me com tanta paciência a parte clínica. Sem dúvida alguma, você é um dos melhores cirurgiões do Brasil. Ao Steferson, uma pessoa batalhadora, um ser humano com muitos sonhos. Com sua coragem está atingindo muitas metas. Voe alto, meu amigo, o mundo nos pertence.

Aos meus grandes amigos Alexandre e Carol. Muito obrigado pelos seus conselhos. Admiro muito vocês pela sua luta e coragem, e pela forma como encaram a vida. Dou graças a Deus por ter colocado vocês como parte da minha família; com certeza meu filho sempre se sentirá feliz com a escolha que fizemos para ele.

Aos meus sogros Rui e Jane, aos cunhados Demian e Gustavo, por torcerem por minha felicidade e serem uma família para mim.

Àquelas pessoas que me ajudaram, me apoiaram e me ofereceram conselhos quando mais eu precisava, desculpem se minha mente esqueceu algum de vocês, mas devem saber que moram todos em meu coração.

Deus os abençoe...

Não tenhas medo, que eu estou contigo,
Não te assustes, que sou o teu Deus.
Eu te dou coragem, sim, eu te ajudo.
Sim, eu te seguro com minha mão
vitoriosa.

Isaías 41:10

Não importa onde você parou ou em que
momento da vida você cansou. Recomeçar
é dar uma nova chance a si mesmo. É
renovar as esperanças.

Carlos Drummond de Andrade

Não é o mais forte que sobrevive, nem o
mais inteligente, mas o que melhor se
adapta às mudanças.

Charles Darwin

RESUMO

Barquero Cordero, E. **Avaliação da formação óssea em implantes usinados de titânio estimulados eletricamente**: estudo em cães. 2012. Tese (Doutorado em Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

O estímulo elétrico tem sido utilizado para a cicatrização nos tratamentos de fratura refratária ou deficiência na consolidação. São poucos os estudos que relatam este tipo de estímulo na odontologia, especialmente na implantodontia. No presente estudo foram usinados implantes dentários sem tratamento de superfície, assim como foi testado e confeccionado um dispositivo elétrico acoplado a eles. O **objetivo** do presente estudo foi avaliar o contato osso/implante e a área de formação óssea em implantes associados a um dispositivo que emite um estímulo elétrico contínuo com duas diferentes amplitudes, colocados em um modelo animal. **Material e métodos**: Foram colocados 90 implantes de titânio com superfície usinada em 6 cães da raça *Beagle*. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois tempos de avaliação, de 7 e 15 dias (3 animais por tempo) e em cada uma de suas patas foi instalado o mesmo grupo de amostras. Para o grupo A: 10 μ A, B: 20 μ A e C: controle. **Resultados**: Obtidos por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para as comparações múltiplas e com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para o grupo de 7 dias não ocorreram diferenças estatísticas; para o grupo de 15 dias o estudo apresentou diferenças estatísticas significantes entre os grupos, seja quando avaliado o contato osso/implante, seja pela área periférica ao implante ($p < 0,01$). Exceção feita quando comparadas as áreas do grupo A (10 μ A) e do grupo C (controle), com relação às quais não houve diferença estatística ($p > 0,05$). **Conclusão**: O estímulo elétrico associado aos implantes de titânio possui a capacidade de gerar maior contato osso/implante, bem como maior formação óssea, quando comparado com implantes que não utilizam este estímulo.

Palavras-chave: Estímulo elétrico. Corrente contínua. Crescimento ósseo. Implantes de titânio.

ABSTRACT

Barquero Cordero, E. **Evaluation of the bone formation in titanium machined implants electrically stimulated**: study in dogs. 2012. Thesis (Doutorado em Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

Electrical stimulation has been used for healing fractures in the treatment of refractory or deficiency in the consolidation. There are few studies that report this type of stimulation in dentistry, especially in implantology. In the present study were machined dental implants without surface treatment, as was made and tested an electrical device coupled there to. **Objective:** Measure the contact bone/implant and bone area, which was stimulated through amplitude of direct electric current (DC) of 10 μA and 20 μA , in a period of 7 and 15 days. The study was accomplished in dogs. **Materials and methods:** It was inserted in six Beagle dogs: 90 titanium implants with machined-surface. The animals were divided randomly in two evaluation times: 7 and 15 days (3 animals per time), and a group of implants was inserted in each of their paws. For group A: 10 μA , B: 20 μA and C: control. **Results:** Evaluated by analysis of variance (ANOVA) and Tukey test for multiple comparisons and significance level of 5% ($p < 0.05$). For the group of seven days we had no statistical differences, while the groups of 15 days showed significant differences between them, either when evaluated contact bone/implant and bone area ($p < 0.01$). Exception occurs when comparing the bone areas of group A (10 μA) and group C (control), which showed no statistical difference ($p > 0.05$). **Conclusion:** The electrical stimulation associated to the dental implants when receiving electric stimuli, can generate greater contact bone/implant, as can bone formation when compared with those which do not use this stimulus.

Keywords: Titanium implant. Electrical stimulation. Bone formation. Direct current.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	15
1.1 INTRODUÇÃO	15
1.2 JUSTIFICATIVA.....	19
1.3 OBJETIVOS	19
1.3.1 Objetivo geral	19
1.3.2 Objetivos específicos	19
2 ARTIGO I	21
2.1 RESUMO	21
2.1.1 Introdução.....	22
2.1.2 Material e método	23
2.1.2.1 Considerações éticas	23
2.1.2.2 Metodologia	23
2.1.2.3 Dispositivo elétrico	24
2.1.2.4 Anestesia e procedimento cirúrgico	24
2.1.3 Avaliação histológica.....	25
2.1.4 Análise estatística	25
2.1.5 Resultados	25
2.1.6 Discussão	26
2.1.7 Conclusão	29
2.1.8 Referências.....	30
2.1.9 Figuras.....	33
2.1.10 Tabelas e gráficos	36
3 ARTIGO II – VERSÃO EM INGLÊS.....	37
3.1 ABSTRACT	37
3.1.2 Introduction	37
3.1.3 Material and method.....	39
3.1.3.1 Ethical considerations	39
3.1.3.2 Methodology	39
3.1.3.3 Electric device	40
3.1.3.4 Anesthesia and surgical procedure	40
3.1.4 Histological evaluation.....	41

3.1.5 Statistical analysis	41
3.1.6 Results	41
3.1.7 Discussion.....	42
3.1.8 Conclusion.....	45
3.1.9 References	45
3.1.10 Pictures.....	46
3.1.11 Tables and graphs	48
4 BIBLIOGRAFIA	51
5 METODOLOGIA EXPANDIDA	59
5.1 CONFECÇÃO DOS IMPLANTES	59
5.2 DISPOSITIVO ELÉTRICO.....	59
5.3 METODOLOGIA	61
5.4 ANESTESIA E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	61
5.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	65
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética.....	67

1 INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

A osseointegração é definida como o contato direto, estrutural e funcional entre o osso organizado e saudável e a superfície do implante (ALBREKTSSON, 1988). O tempo necessário para que um implante se torne funcional depende da qualidade do contato entre osso e implante, além da sua capacidade em resistir às forças incidentes sobre ele (JUFIN et al., 1991). A literatura relata que o período médio de cicatrização é de aproximadamente 12 semanas na maxila e de 6 semanas na mandíbula (PULEO et al., 1999).

O desenvolvimento de novas técnicas para acelerar a formação óssea e, conseqüentemente, para encurtar o período de osseointegração faz com que os implantes de titânio venham sofrendo diferentes modificações em suas estruturas macroscópica e microscópica.

Diferentes tratamentos de superfície têm sido realizados com o objetivo de alterar a microtopografia do titânio, como, por exemplo, ataque ácido (ORSINI et al., 2000), *spray* de plasma (ELLINGSEN et al., 1998), oxidação anódica (YAMAGAMI et al., 2005) e fosfato-cálcio ou combinações desses tratamentos (YAMAGAMI et al., 2005). Essa texturização induz as plaquetas a liberar fatores de crescimento (PDGF) (BUSER et al., 1991) e melhora a osteogênese (DAVIES, 2007; GOTTLANDER et al., 1997). A interface entre osso e implante sob a óptica da topografia microscópica oferece melhor adesão para a rede de fibrina, assim como as propriedades específicas das proteínas do meio intercelular contribuem para a organização da camada de proteínas adsorvidas e a natureza destas determina a resposta celular aos implantes (LAMPIN et al., 1997). As moléculas envolvidas na adesão e proliferação celulares incluem moléculas da matriz extracelular, receptores transmembrana e componentes do citoesqueleto. Dentre as proteínas do plasma, a fibronectina e a vitronectina têm sido relacionadas à promoção da adesão celular e à reorganização dos microfilamentos de actina (PULEO et al., 1999; DESGANE et al., 1999). A albumina humana apresenta alta afinidade pelo titânio (KLINGER et al., 1997) e é uma proteína não adesiva para os osteoblastos (PULEO et al., 1992) que age como carreadora para proteínas menores e para lipídios, além de ser mantenedora do tampão do pH do sangue. A concentração dessa proteína no plasma humano é cerca de 100 vezes maior do que a de fibronectina. A albumina é a

primeira proteína a chegar à superfície, devido a sua alta concentração e seu baixo peso molecular (DELIGIANNI et al., 2001).

A associação de fatores do plasma com o titânio antes da migração local de células é influenciada pela energia de superfície que, por sua vez, é sensível à rugosidade e à topografia do implante (BOYAN et al., 1996; DAVIES, 1998 e 2003).

A modificação da superfície do implante é importante na velocidade de aposição óssea, uma vez que essa mudança influencia na energia de superfície e em sua "molhabilidade" (hidrofilia) (NAYAB et al., 2005). A hidrofilia, uma característica diretamente dependente da energia de superfície, influencia o nível de contato de um biomaterial com as células presentes no tecido onde ele é inserido. Assim, o aumento da hidrofilia promove maior interação entre os implantes e o ambiente biológico ao seu redor (KIPALDI et al., 1998).

Vários estudos têm sido realizados para tentar explicar a influência da energia de superfície do titânio sobre o comportamento celular (BAIER et al., 1988). A teoria mais amplamente aceita é a de que essas propriedades têm um efeito seletivo sobre a configuração e a conformação das proteínas que são adsorvidas ao substrato, importantes para a adesão celular (UITOO et al., 1992).

Além dessas terapias bioquímicas osteoindutivas, existem as alternativas biofísicas, tais como as mecânicas, sônicas e elétricas (AARON et al., 2006). Estas últimas são aplicadas na ortopedia como tratamento da fratura refratária ou deficiência na consolidação e foram introduzidas em 1841, com Hartshorne (FRED et al., 2003), que descreveu um tratamento para as fraturas por meio de choques elétricos.

Mais de 100 anos depois, o estímulo elétrico foi retomado pela descrição dos potenciais piezelétricos gerados pela tensão mecânica sobre a estrutura cristalina do osso. Autores sugerem que a tensão nos componentes cristalinos do osso produz uma corrente elétrica que desencadeia um processo de cicatrização (YASUDA, 1953).

Outros autores (FUKADA; YASUDA, 1957) demonstraram que sinais elétricos similares aos gerados pelos mecanismos de estresse podem melhorar a cicatrização da fratura.

A hipótese central na aplicação de forças mecânicas como as geradas por potenciais elétricos é a da regulação da sinalização celular na formação óssea, com a ideia de que esses campos elétricos seriam importantes no processo de reparo (BASSETT, 1962).

O estímulo elétrico, dependendo da natureza dos sinais fornecidos, pode ser classificado em 3 grupos: estímulo indutivo, estímulo capacitivo e estímulo de corrente contínua.

O primeiro estímulo é um método não invasivo que utiliza uma bobina ou par de bobinas ligadas em série, com seus eixos perpendiculares ao osso para gerar campos eletromagnéticos pulsáteis (PEMFs), assim como pequenos campos elétricos secundários (BLACK, 1987). Este tipo de estímulo tem mostrado uma influência nas células responsáveis pela formação óssea (BRIGHTON et al., 2001) e na expressão de gene (SCHWARTZ et al., 2008). No estímulo capacitivo (CS), também um método não invasivo, são aplicados eletrodos externamente sobre o local da área onde vai ser ministrado o estímulo, induzindo um campo elétrico que pode influenciar as células responsáveis pelo crescimento ósseo (SHIGINO et al., 2001; WANG et al., 2006). O estímulo elétrico de corrente contínua (CC) é um método invasivo pelo qual aplica-se um campo elétrico através da superfície sobre a qual as células estão crescendo, ou indiretamente, através do meio no qual elas estão crescendo (BRIGHTON et al., 1981).

O referencial teórico e biológico sobre por que os estímulos elétricos podem acelerar o reparo ósseo não é totalmente entendido, mas algum conhecimento está disponível, já que tem sido avaliado em diferentes modelos de estudo.

Estudos *in vitro* demonstraram que o estímulo elétrico, seja por corrente contínua ou pela geração de um campo elétrico, melhora a proliferação de células (ARO et al., 1984), aumentando a liberação de prostaglandina E (KOREINSTEIN et al., 1984) e a síntese de matriz extracelular (FRIENDERBERG et al., 1989).

Estudos com animais (BUCH et al., 1984; ALBREKTSSON e HERBS, 1986) foram efetuados para avaliar a influência do estímulo da corrente contínua na formação de osso ao redor de implantes de titânio colocados em tibia de coelhos e quantificaram a osteogênese induzida por este processo. Os autores relataram que houve um aumento significativo da osteogênese. Outro estudo determinou as alterações sofridas pelos potenciais elétricos no osso durante e depois do estímulo elétrico; os autores sugeriram a existência de uma relação entre os potenciais bioelétricos, a corrente contínua e a osteogênese (RUBINACCI et al., 1984).

Estímulos elétricos associados aos implantes dentários foram realizados para analisar sua efetividade, valendo-se de uma fonte externa acoplada aos implantes que foram colocados na mandíbula de coelhos, utilizando uma amplitude de corrente elétrica de 7,5 μ A. Os autores concluíram que o emprego de eletricidade não tem efeito positivo na cicatrização óssea (SHAFER et al., 1995).

Estudos avaliaram o efeito da aplicação do estímulo elétrico na melhora da osteogênese utilizando implantes dentários (SHIGINO et al., 2000). Com uma aplicação diária por 14, 21 e 30 dias, os pesquisadores relataram aumento significativo no contato entre osso e implante, comparado com o grupo controle, de 90 dias. O mesmo grupo de pesquisadores, no ano seguinte (SHIGINO et al., 2001), avaliou os efeitos do estímulo elétrico na osteogênese seguida por uma carga funcional dos implantes dentários. Sugeriram que o estímulo capacitivo aumenta a área de osso e também promove a osteogênese, levando a um possível período reduzido de osseointegração. Em outro estudo foram examinados os efeitos de um estímulo capacitivo distribuído por um gerador colocado mucoperiostealmente sobre implantes dentários (SHAYESTEH et al., 2007). Os resultados sugerem a existência de um maior contato de osso sobre os implantes com estímulo elétrico, comparados com o grupo controle. Outra avaliação foi feita sobre o efeito da aceleração na formação óssea por meio de um dispositivo eletrônico ligado ao implante dentário com uma corrente elétrica de 20 μA de intensidade durante duas e cinco semanas. Os resultados histológicos mostram uma aceleração da formação óssea ao redor dos implantes, sugerindo que o tempo de latência da osseointegração em implantes dentários pode ser reduzido quando são utilizados os estímulos elétricos (SONG et al., 2009).

Barquero e colaboradores, no ano 2010, avaliaram a influência de estímulos elétricos por meio do torque de remoção nos implantes dentários. A estimulação de corrente contínua foi realizada através de um dispositivo elétrico acoplado ao implante dentário. O equipamento transmitiu diferentes amplitudes de corrente elétrica (10 μA e 20 μA) em diferentes períodos (7 e 15 dias). Os autores não encontraram diferenças significativas entre os grupos testes e controle.

Um grupo de pesquisadores (DERGIN et al., 2011) utilizou um microestimulador de corrente contínua de 7,5 μA associado a implantes dentários colocados na tíbia de ovelhas. Depois de períodos de 1, 2 e 3 meses avaliando o contato e a formação óssea, os autores não encontraram evidência de que essa amplitude de corrente influenciaria a osseointegração.

Segundo a literatura apresentada, as pesquisas sugerem ser a utilização de estímulos elétricos, associados ou não aos implantes dentários, uma alternativa para potencializar a formação óssea em diferentes modelos de estudo, tempo e amplitude.

1.2 JUSTIFICATIVA

Um dos fatores imprescindíveis para se obter sucesso em implantes dentários é que eles exerçam adequadamente as funções mastigatórias. Para que um implante dentário seja funcional, é necessário haver osseointegração. Após a instalação do implante dentário, o tempo médio de espera para que se possa instalar a prótese sobre implante é de 90 dias na maxila e de 60 dias na mandíbula. Com a redução do tempo necessário para a osseointegração, a prótese sobre implante poderia ser instalada em menos tempo.

A proposta deste estudo é buscar uma alternativa que possibilite a redução do tempo de osseointegração por meio de um dispositivo elétrico instalado dentro do implante.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Analisar a eficácia de um dispositivo elétrico que seja capaz de estimular o reparo de tecido ósseo e, conseqüentemente, acelerar a formação óssea em implantes de titânio.

1.3.2 Objetivos específicos

- Mensurar o contato entre osso e implante, assim como a área de formação óssea, por meio de análise histológica;
- Estabelecer a melhor amplitude de corrente elétrica nos implantes de titânio para estimular a osteogênese;
- Estabelecer o tempo necessário de estímulo elétrico em implantes de titânio para promover osteogênese.

2 ARTIGO I

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO ÓSSEA EM IMPLANTES USINADOS DE TITÂNIO ESTIMULADOS ELETRICAMENTE: ESTUDO EM CÃES¹

2.1 RESUMO

Objetivo: Mensurar o contato osso/implante e a área de formação óssea, estimulados por meio de uma amplitude de corrente elétrica contínua (CC) de 10 μ A e 20 μ A, em um período de 7 e 15 dias, em um estudo realizado em cães.

Materiais e métodos: Foram colocados 90 implantes de titânio com superfície usinada em 6 cães da raça *Beagle*. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois tempos de avaliação, de 7 e 15 dias (3 animais por tempo), e em cada uma de suas patas foi instalado o mesmo grupo de amostras. Para o grupo A: 10 μ A, B: 20 μ A e C: controle.

Resultados: Obtidos por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para as comparações múltiplas e com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para o grupo de 7 dias não ocorreram diferenças estatísticas; para o grupo de 15 dias o estudo apresentou diferenças estatísticas significantes entre os grupos, seja quando avaliado o contato osso/implante, seja pela área periférica ao implante ($p < 0,01$). Exceção feita quando comparadas as áreas do grupo A (10 μ A) e do grupo C (controle), com relação às quais não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Conclusão: O estímulo elétrico associado aos implantes dentários possui a capacidade de gerar maior contato osso/implante, bem como maior formação óssea, quando comparado com implantes que não utilizam este estímulo.

Palavras-chave: Estímulo elétrico, corrente contínua, formação óssea, implantes de titânio.

1 [□] Este artigo está formatado sob as normas da revista *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery (JOMS)*.

2.1.1 Introdução

A osseointegração é definida como o contato direto, estrutural e funcional entre o osso organizado e saudável e a superfície do implante¹. O tempo necessário para que um implante se torne funcional depende da quantidade do contato entre osso e implante e da sua capacidade em resistir às forças incidentes sobre ele². A literatura relata que o período médio de osseointegração é de aproximadamente 12 semanas na maxila e de 6 meses na mandíbula³.

O desenvolvimento de novas técnicas para acelerar a formação óssea e, conseqüentemente, encurtar o período de latência dos implantes, faz com que estes venham sofrendo diferentes modificações na sua estrutura macroscópica e microscópica.

Diferentes tratamentos de superfície têm sido realizados com o objetivo de alterar a microtopografia do titânio, como, por exemplo: ataque ácido⁴, *spray* de plasma⁵, oxidação anódica⁶, fosfato-cálcio ou combinações desses tratamentos⁶. Essa texturização induz as plaquetas a liberar fatores de crescimento (PDGF)⁷ e melhorar a osteogênese^{8,9}. A modificação da superfície do implante é importante na velocidade de aposição óssea, uma vez que essa mudança influencia em sua energia de superfície e "molhabilidade" (hidrofilia)¹⁰. A hidrofilia influencia o nível de contato de um biomaterial com as células presentes no tecido onde ele é inserido. Assim, o aumento da hidrofilia promove uma maior interação entre os implantes e o ambiente biológico ao seu redor¹¹.

Vários estudos têm sido realizados para se tentar explicar a influência da energia de superfície do titânio sobre o comportamento celular¹². A teoria mais amplamente aceita é a de que estas propriedades têm um efeito seletivo sobre a configuração e conformação das proteínas que são adsorvidas sobre o substrato, sendo elas importantes durante a adesão celular¹³⁻¹⁵.

Uma alternativa às terapias bioquímicas osteoindutivas é o tratamento biofísico, tais como o mecânico, o sônico e o elétrico¹⁶. Esta última terapia é aplicada na ortopedia como tratamento da fratura refratária ou deficiência na consolidação, e teve seu início em 1841, com Hartshorne¹⁷, que descreveu um tratamento para fraturas por meio de choques elétricos.

Mais de 100 anos depois, o estímulo elétrico foi retomado pela descrição dos potenciais piezelétricos gerados pela tensão mecânica sobre a estrutura cristalina do osso^{18,19}. Autores sugerem que a tensão nos componentes cristalinos do osso produz uma corrente elétrica que desencadeia um processo de cicatrização¹⁹.

Diversos autores²⁰ demonstraram que sinais elétricos similares aos gerados pela tensão óssea podem melhorar a cicatrização da fratura. A hipótese central é que a aplicação de forças mecânicas como as geradas por potenciais elétricos regula a sinalização celular na formação óssea, com a ideia de que esses campos elétricos influenciariam de forma importante o processo de reparo^{21,22}.

O estímulo elétrico, dependendo da natureza dos sinais fornecidos, pode ser classificado em 3 grupos: estimulação indutiva, estimulação capacitiva e estimulação de corrente contínua.

Neste estudo foi utilizado um estímulo elétrico de corrente contínua (CC). Trata-se de um método invasivo pelo qual é aplicado um campo elétrico através da superfície sobre a qual as células estão crescendo ou, indiretamente, através do meio no qual elas estão crescendo²³. São aplicados diferentes parâmetros de correntes²⁴, que vão de 1 μ A a 50 μ A, os quais podem influenciar na proliferação de osteoblastos²⁴, assim como nos marcadores de diferenciação e de expressão óssea²⁵.

O presente trabalho apresenta a aplicação de uma corrente contínua (CC) associada aos implantes dentários como uma forma de potencializar a formação óssea e diminuir o tempo necessário para que exista osseointegração.

2.1.2 Material e método

2.1.2.1 Considerações éticas

O presente estudo foi submetido à análise do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, recebendo aprovação sob o parecer nº 114/CEUA/PRPe/2008.

2.1.2.2 Metodologia

Foram confeccionados 90 implantes de titânio com 6,0 mm de diâmetro por 11,5 mm de comprimento, com superfície usinada e esterilizados por raios gama.

Seis cães machos da raça *Beagle*, com aproximadamente 12 meses de idade e peso aproximado de 15 kg, foram utilizados.

Para a realização da intervenção cirúrgica, os animais foram divididos aleatoriamente em dois tempos de avaliação, de 7 e 15 dias (3 animais por tempo), e em cada uma de suas patas foi colocado o mesmo

grupo de amostras e cada pata foi casualizada. Assim, a distribuição dos grupos em relação ao tipo de variável por animal foi a seguinte:

Tempo 1: 7 dias, 3 animais

- a) 5 implantes com dispositivo elétrico com 10 μA ;
- b) 5 implantes com dispositivo elétrico com 20 μA ;
- c) 5 implantes sem dispositivo elétrico.

Tempo 2: 15 dias, 3 animais

- a) 5 implantes com dispositivo elétrico com 10 μA ;
- b) 5 implantes com dispositivo elétrico com 20 μA ;
- c) 5 implantes sem dispositivo elétrico.

2.1.2.3 Dispositivo elétrico

O dispositivo elétrico é formado por uma bateria (fonte de energia) e um circuito eletroeletrônico capaz de transmitir uma corrente elétrica contínua de 10 μA ou 20 μA dentro de um implante dentário (Figuras 1, 2 e 3).

2.1.2.4 Anestesia e procedimento cirúrgico

Previamente ao procedimento cirúrgico, cada cão recebeu uma injeção, por via intramuscular, de sulfato de atropina 0,50 mg (Atropinon[®], Hipolabor Farmacêutica Ltda., Sabará, MG, Brasil), na dosagem de 0,44 mg/kg. Após 10 minutos, foram aplicados xilazina (Rompun[®], Bayer S. A., São Paulo, SP, Brasil), na dosagem de 3 mg/kg, e cloridrato de quetamina 1,0 mg (Francotar[®], Virbac, Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil), na dosagem de 16 mg/kg, ambos por via intramuscular, em uma única injeção. Em casos de necessidade, fez-se reforço anestésico com a metade da dose-mãe. Realizou-se uma incisão longitudinal sobre a tíbia para expor o tecido ósseo subjacente. Os implantes foram instalados utilizando-se fresas de diâmetros seriados, sob refrigeração por irrigação constante com soro fisiológico à temperatura ambiente, até atingir o diâmetro dos implantes. Instalaram-se os implantes e os dispositivos elétricos conforme os grupos. Os acessos foram suturados em dois planos, internamente com fio Vicryl reabsorvível 5.0 (Ethicon-Vicryl[®], Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) e externamente com fio de náilon 4.0 (Somerville[®], Pernambuco, Brasil).

Os animais foram levados a uma morte indolor induzida (MII), segundo os tempos de avaliação predeterminados, por administração de dose letal de anestésico tiopental sódico (Thionembutal[®]).

2.1.3 Avaliação histológica

As peças foram dissecadas e blocos com as amostras foram obtidos e mantidos em solução de formalina 10% por 24 horas, posteriormente lavados com água corrente e gradualmente desidratados seriadamente em soluções alcoólicas 50 - 100%. Após a desidratação, as amostras foram embebidas em resinas à base de metacrilato (Technovit - 7200) de acordo com as recomendações do fabricante. Depois da polimerização, os blocos foram seccionados ao longo do eixo do implante, na sua porção medial (Exakt Apparatebau GmbH & Co., Norderstedt, Alemanha), e, em seguida, as amostras foram reduzidas por desgaste sob abundante irrigação com água corrente até uma espessura de 50 μm (Exakt Apparatebau GmbH & Co., Norderstedt, Alemanha). Posteriormente as lâminas foram coradas com azul de toluidina (Merck) e fucsina ácida (Merck).

As imagens foram obtidas através de um microscópio ótico com uma ampliação de 100 x (Leica IC50 HD, Microsystems & Switzerland), o qual possui uma máquina fotográfica incorporada. A sequência de imagens foi agrupada com o auxílio de um *software* específico (Leica Aquire Mac). A análise e mensuração do contato entre osso e implante e da área de osso foram realizadas no programa Axio Vision (Carl Zeiss, Alemanha).

2.1.4 Análise estatística

Realizaram-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para as comparações múltiplas. Adotou-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

2.1.5 Resultados

Seguindo a metodologia proposta, os resultados foram que, para o grupo de 7 dias, não ocorreram diferenças estatísticas entre as amostras (Fig. 4). Para o grupo de 15 dias, as amostras com estímulo elétrico (10 μA e 20 μA) apresentaram aumento significativo no contato entre osso e implante e na área periférica ao implante (Fig. 5) em comparação às amostras sem estímulo ($p < 0,05$) (Tabela 1 e Gráfico 1). Entretanto,

quando comparadas as áreas do grupo A (10 μ A) e do grupo C (controle), não houve diferença estatística ($p > 0,05$) (Tabela 2 e Gráfico 2).

2.1.6 Discussão

A aceleração do tempo de cicatrização por meio de estímulos elétricos em estudos com animais ainda é controversa. Tal estimulação depende do método de distribuição dos sinais. Em estudos realizados por Shigino e colaboradores em 2000²⁶ e em 2001²⁷, foi avaliada a formação óssea por meio de estímulo capacitivo associado a implantes dentários em mandíbula de cães. Os resultados mostraram um aumento significativo do contato entre osso e implante e da área óssea quando comparado com o grupo controle. Entretanto, Shafer e colaboradores²⁸, em 1995, avaliaram o efeito do estímulo elétrico emitido por um sinal externo de 7,0 μ A na osseointegração dos implantes dentários colocados na mandíbula de coelhos. Os autores concluíram que o método com essa magnitude de sinal não promove crescimento ósseo. Shayesteh e colaboradores²⁹, em 2007, colocaram, na mandíbula de cães, implantes associados a um sinal elétrico externo de 20 μ A; os autores sugerem que a corrente elétrica pode estimular a formação de osso ao redor dos implantes dentários. Matsumoto e colaboradores³⁰, em 2000, examinaram a influência da aplicação do estímulo indutivo sobre o osso ao redor de implantes dentários colocados em fêmures de coelhos, sugerindo que esse tipo de estímulo pode promover o crescimento ósseo em torno dos implantes, porém é importante selecionar uma adequada intensidade e duração do impulso elétrico, assim como a duração do tratamento. Na presente pesquisa utilizou-se uma corrente contínua pelo motivo de que esse método exige o contato direto com o osso, onde o implante torna-se um cátodo, o ânodo fica exposto na cavidade oral e os tecidos circundantes servem como caminho para fechar o circuito e, assim, permitirem o fluxo da corrente elétrica²⁴. O mecanismo de ação deste estímulo (CC) envolve a regulação de alguns fatores, que são osteoindutores, os quais são reguladores fisiológicos da formação óssea. As reações eletroquímicas que ocorrem no cátodo contribuem para o mecanismo de ação de estímulo elétrico constante³¹. Sugere-se que, ao redor do cátodo, ocorram reações onde existe uma diminuição na concentração do oxigênio, aumentando o pH e produzindo radicais de hidroxila, de acordo a seguinte equação: $2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- + \text{O}_2 \rightarrow 4\text{OH}^-$ ^{23, 31,}

A baixa concentração de oxigênio dos tecidos é favorável ao aumento da atividade osteoblástica, enquanto o ambiente alcalino favorece a atividade dos osteoblastos e diminui a atividade osteoclástica. Adicionalmente, o peróxido de hidrogênio estimula os macrófagos a liberar o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é um fator angiogênico crucial para a cicatrização óssea³³.

O estímulo elétrico contínuo, sugere-se, regula o mRNA para os fatores de crescimento osteoindutores tais como BMP -2, -6 e -7, que são conhecidos como estimuladores de formação óssea e cartilaginosa, proliferação celular, diferenciação e síntese de matriz extracelular^{34,35}.

As outras técnicas disponíveis são métodos não invasivos também utilizados para a cicatrização óssea, como o caso do estímulo capacitivo e do estímulo indutivo. Entretanto, para a primeira há a necessidade de altas voltagens e frequências, fatores que podem causar irritação no local estimulado²⁴. No caso da segunda técnica, precisa-se de grandes equipamentos e espaço para sua aplicação^{15,16}.

A literatura mostra diferentes faixas de períodos e amplitudes de corrente a serem estudados, sendo aqueles de 1 semana até 3 meses. A escolha dos períodos, no presente estudo, baseou-se nas fases específicas da cicatrização óssea em cães, correlacionadas com as taxas de reparo ósseo em humanos³⁶. A remodelação óssea pode ser dividida em ativação, reabsorção ativa, latência e formação. A remodelação inicia-se com uma fase de ativação que dura horas ou dias, seguida da reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos. Este período de reabsorção perdura por 10 dias nos cães e por 14 dias no homem. A fase de latência tem duração de 1 semana nos cães e de 1 a 2 semanas no homem, aproximadamente. Nesta fase, os osteoclastos são substituídos por osteoblastos, dando início à fase de neoformação óssea. A matriz osteoide alcança a superfície do implante na quarta semana, em cães, e na sexta, em humanos. Após aproximadamente 2 meses e meio nos cães, e 3 meses no homem, a cavidade resultante da reabsorção é preenchida por tecido ósseo. Tendo por base esses parâmetros, os períodos experimentais escolhidos nesta pesquisa foram de 7 e 15 dias. Deste modo, o momento de inserção do implante corresponde ao período 0. Os 7 dias correspondem ao período de reabsorção, o que, em humanos, corresponderia a uma intensa atividade celular, existindo migração de novos capilares para o interior do coágulo (angiogênese); com isso, pode-se explicar por que, no atual estudo, entre o grupo teste e o grupo controle de 7 dias não se encontraram diferenças estatísticas, entretanto, no grupo sem estímulo elétrico conseguiu-se observar um maior infiltrado inflamatório do que no grupo experimental. Os 15 dias

correspondem aos períodos de reabsorção e fase de latência do ciclo de remodelação óssea que, em humanos, equivalem a uma fase de coalescência das ilhas osteoides individuais à superfície, gerando o processo de consolidação clínica do implante, que aumentou quando foram aplicados estímulos elétricos, como exposto na presente pesquisa, em que os grupos testes apresentaram uma diferença estatística, a saber: um maior contato entre osso e implante e maior área de osso do que o grupo controle.

Diferentes amplitudes de corrente têm sido aplicadas para a formação de osso; no caso de corrente contínua, de 7 μA a 50 μA ¹⁶. Entretanto, necroses de osso têm sido relatadas quando é utilizada uma alta corrente elétrica ^{37, 38}. O presente trabalho utilizou as magnitudes de 10 μA a 20 μA , já que a literatura relata que ambas promovem maior crescimento ósseo quando empregadas. Hagiwara e Bell ³⁹, em 2000, analisaram o uso do estímulo elétrico de corrente contínua de 10 μA durante o alongamento mandibular para acelerar a formação óssea. Os resultados indicaram que esse estímulo, durante uma tração gradual, pode reduzir o tempo total do alongamento. El-Hakim e colaboradores ⁴⁰, em 2004, utilizando uma corrente contínua, testaram o efeito dessa corrente na tração osteogênica durante diferentes fases dela; os resultados mostraram sinergismo quando este estímulo é aplicado à zona de tração durante a ativação ou consolidação, e pode encurtar a duração total do alongamento, assim como o tracionador pode ser removido antes da cicatrização. Bringhton e colaboradores ⁴¹, em 1977, utilizaram uma corrente contínua de 10 μA a 20 μA no tratamento de deficiência de consolidação de fratura em 57 pacientes. Os resultados mostraram que, dos 57 pacientes, 39 foram curados, sugerindo que parâmetros elétricos específicos são necessários para o sucesso na estimulação osteogênica dos pacientes. Este estudo, juntamente com pesquisas em animais, determinou a preferência por corrente contínua (CC) de 20 μA .

Escassas são as pesquisas que avaliam o uso de corrente contínua associada aos implantes dentários, por conta das limitações de espaço e de tamanho na hora de confeccionar um dispositivo dentro do implante dentário, o que também se mostrou uma limitação na presente pesquisa, algo que foi contornado com o aumento do diâmetro do implante. Entretanto, clinicamente o tamanho adotado é pouco utilizado, porém um dos intuitos da pesquisa foi observar se esse tipo de dispositivo elétrico influencia no crescimento ósseo, objetivo atendido com os resultados demonstrados no presente trabalho. Song e colaboradores ⁴², em 2009, utilizaram um estimulador BEC, que consiste em um pulso de onda bifásica similar ao utilizado no PMFE com uma amplitude de

corrente de 20 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Este estimulador foi colocado imediatamente durante a cirurgia de instalação do implante e, após uma semana, foi removido e substituído por um cicatrizador; depois de 2 e 4 semanas foram obtidas as amostras. O processo dos pesquisadores difere do que foi adotado no presente estudo, que utiliza uma corrente contínua com duas amplitudes de corrente (10 μA e 20 μA) colocadas logo em seguida à instalação do implante e mantidas durante todo o período de avaliação. Entretanto, os resultados de ambas as pesquisas são similares, partindo-se da constatação de que os grupos com estímulos elétricos apresentam maior contato entre osso e implante e maior área de osso do que os grupos controles. Porém, outro estudo, realizado por Dergin e colaboradores⁴³, em 2011, utilizou um microestimulador de corrente contínua de 7,5 μA associado a implantes dentários colocados na tíbia de ovelhas. Depois de períodos de 1, 2 e 3 meses avaliando o contato e a formação óssea, os autores não encontraram evidência de que essa amplitude de corrente favorece a osseointegração.

A utilização de estímulos elétricos na maioria dos modelos, assim como sua distribuição e a amplitude do sinal, pelas razões de influenciar na proliferação, diferenciação e expressão dos marcadores ósseos, tem demonstrado que a corrente elétrica não só incrementa a formação de osso como ajuda na cicatrização óssea. Por toda a discussão anteriormente apresentada, mais os achados desta e de outras pesquisas, pode-se sugerir que o estímulo elétrico potencializa a formação óssea e diminui o tempo de cicatrização. No entanto, deveriam ainda ser feitas pesquisas comparando este modelo de estudo com implantes dentários já constituídos no mercado.

2.1.7 Conclusão

O estímulo elétrico associado aos implantes dentários possui a capacidade de gerar maior contato entre osso e implante, assim como maior formação óssea, quando comparado com implantes que não utilizam este estímulo.

2.1.8 Referências

1. Albrektsson TA. Multicenter report on osseointegrated oral implants. *J Prosthet Dent.* 1988;60(1):75-84.
2. Jaffin RA, Berman CL. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. *J Periodontol.* 1991;62:2.

3. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*. 1999;20:2311-21.
4. Orsini G, Assenza B, Scarana A, Piatelli M, Piatelli A. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15:779-84.
5. Ellingsen JE. Surface configurations of dental implants. *Periodontol 2000*. 1998;17:36-46.
6. Yamagami A, Yoshihara Y, Suwa F. Mechanical and histologic examination of titanium alloy material treated by sandblasting and anodic oxidization. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20:48-53.
7. Gottlander M, Johansson CB, Wennerberg A, Albrektsson T, Radin S, Ducheyne P. Bone tissue reactions to an electrophoretically applied calcium phosphate coating. *Biomaterials*. 1997;18(7):551-557.
8. Davies JE. Bone bonding at natural and biomaterial surface. *Biomaterials*. 2007;28:5058-67.
9. Buser D, Schenk Rk, Steinemann S, Fiorellini Jp, Fox Ch, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants a histomorphometric study in miniature pig. *J Biomed Mater Res*. 1991;25(7):889-902.
10. Davies JE. Understanding Peri-Implant Endosseus Healing 2005. Re-issued from: *J Dent Educ*. 2003;67(8):932-49.
11. Nayab SN, Jones FH, Olsen I. Effects of calcium ion implantation on human bone cell interaction with titanium. *Biomaterials*. 2005;26:4717-27.
12. Kilpadi DV, Weimer JJ, Lemons JE. Effect of passivation and dry heat sterilization on surface energy and topography of unalloyed titanium implants. *Colloids and Surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1998;135:89-101.
13. Baier RE, Meyer AE. Implant surface preparation. *Int J Maxillofac Impl*. 1988;3(1):9-20.
14. Uitto VJ, Larjava H, Peltonen J, Brunette DM. Expression of fibronectin and integrins in cultured periodontal ligament epithelial cells. *J Dent Res*. 1992;71(5):1203-11.
15. Aaron R, Ciombor D, Wang S, Simon B. Clinical biophysics: the promotion of skeletal repair by physical forces. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1068:513-31.
16. Nelson FRT, Brighton CT, Ryaby J, Simon BJ, Nielson JH, Lorch DG, et al. Use of physical forces in bone healing. *J Am Acad Orthop Surg*. 2003;11:344-54.

17. Hartshorne E. On the causes and treatment of pseudarthrosis and especially the form of it sometimes called supernumerary joint. *Am J Med.* 1841;1:121-56.
18. Lente RW. Cases of un-united fracture treated by electricity. *New York State J Med.* 1850;5:317-9.
19. Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect of bone. *J Phys Soc Japan.* 1957;12:1158-62.
20. Yasuda I. [Fundamental aspects of fracture treatment]. *J Kyoto Med Soc.* 1953.4:395-406.
21. Bassett CAL, Becker RO. Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. *Science.* 1962;137:1063-1064.
22. Black J, Baranowski TJ, Brighton CT. Electrochemical aspects of DC stimulation of osteogenesis. *Bioelectro and Bioener.* 1984. 12:323 – 327.
23. Brighton CT, Black J, FriedenberG ZB, Esterhai JL, Day LJ, Connolly JF: A multicenter study of the treatment of nonunion with constant direct current. *J Bone Joint Surg Am.* 1981. 63: 2 – 13.
24. Gittens R.A, Olivares-Navarrete R, Tannenbaum R, Boyan B.D, Schwartz Z. Electrical implications of corrosion for osseointegration of titanium implants. *J Den Res.* 2011. 90 (12): 1389 – 1397.
25. Kim IS, Song JK, Zhang YL, Lee TH, Cho TH, Song YM. Biphasic electric current stimulates proliferation and induces VEGF production in osteoblast. *Biochim Biophys Acta.* 2006. 1763:907 – 916.
26. Shigino T, Ochio M, Sakaguchi H, SaKaguchi K, Nakade O. Application of capacitevely coupled electric field enhances periimplant osteogenesis in the dog mandibule. *Int J Prosthodontic.* 2000;13:365-372.
27. Shigino T, Ochi M, Hirose Y, Hirayama H, Sakaguchi K. Enhancing osseointegration by capacitively coupled electric field: a pilot study on early occlusal loading in the dog mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001 16:841-850.
28. Shafer DM, Rogerson K, Norton L, Benneth J. The effect of electrical perturbation on osseointegration of titanium dental implants: a preliminary study. *J Oral Maxillofac Sur.* 1995,53:1063-1068.
29. Shayesteh YS, Eslami B, Dehghan MM, Vaziri H, Alikhassi M, Mangoli A, et al. The effect of a constant electrical field on

- osseointegration after immediate implantation in dog mandibles: a preliminary study. *J Prosthodont.* 2007 Sep-Oct;16(5):337-42.
30. Matsumoto H, Ochi M, Abiko Y. Pulsed electromagnetic fields promote bone formation around dental implants inserted in to the femur of the rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2000,11:354-360.
 31. Bodamyali T, Kanczler JM, Simon B, Blake DR, Stevens CR. Effect of faradic products on direct current- stimulated calvarial organ culture calcium levels. *Biochem Biophys Res Commun* 1999,264:657-661.
 32. Bushinsky DA. Metabolic alka-losis decreases bone calcium efflux by suppressing osteoclasts and stimulating osteoblasts. *Am J Physiol* 1996, 271:216- 222.
 33. Cho M, Hunt TK, Hussain MZ. Hydrogen peroxide stimulates macrophage vascular endothelial growth factor release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001,280: 2357-2363.
 34. Fredericks DC, Petersen EB, Bobst JA, Gan JC, Simon BJ, Glazer P, Nepola JV. Effects of direct current electrical stimulation on gene expression of osteopromotive factors in a posterolateral spinal fusion model. *Spine* 2006.
 35. Gan JC, Fredericks DC, Glazer PA. Direct current and capacitive coupling electrical stimulation upregu- lates osteopromotive factors for spinal fusions. *Orthop J Harvard Med School* 2004, 6:57-59.
 36. Roberts WE, Turley PK, Brezniak N, Fielder PJ. Bone physiology and metabolism. *J Calif Dent Assoc.* 1987;15:54-61.
 37. Friedenberg ZB, Andrews ET, Smolenski BI, Pearl BW, Brighton CT. Bone reaction to varying amounts of direct current. *Surg Gynecol Obstet.* 1970;131:894-9.
 38. Brighton CT, Friedenberg ZB, Zemsky LZ, Pollis RP. Direct-current stimulation of non-union and congenital pseudoarthrosis. *J Bone Joint Surg.* 1975;57:368-77.
 39. Hagiwara T, Bell W. Effect of electrical stimulation on mandibular distraction osteogenesis. *J Cranio-Maxillofac Surg.* 2000, 28:12-19.
 40. El-Hakim I.E, Azim A, El-Hassan M, Maree S. Preliminary investigation into the effects of electrical stimulation on mandibular distraction osteogenesis in goats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004,33:42-47.
 41. Brighton CT, Friedenberg ZB, Mitchell EI, Boot RE. Treatment of nonunion with constant direct current. *Clin Orthop.*1977, 124:106-123.

42. Song JK, Cho TH, Pan H, Song YM, Kim IS, Lee TH, et al. An electronic device for accelerating bone formation in tissues surrounding a dental implant. *Bioelectromagnetics*. 2009,30:374-84.
43. Dergin G, Aktas M, Gürsoy B, Kürkçü M, Devecioglu Y, Benliday E. Direct Current Electric Stimulation in Implant Osseointegration: An experimental animal study with sheep. *J Oral Implantol*. 2011, 21.

2.1.9 Figuras

Figura 1 – Desenho do dispositivo elétrico

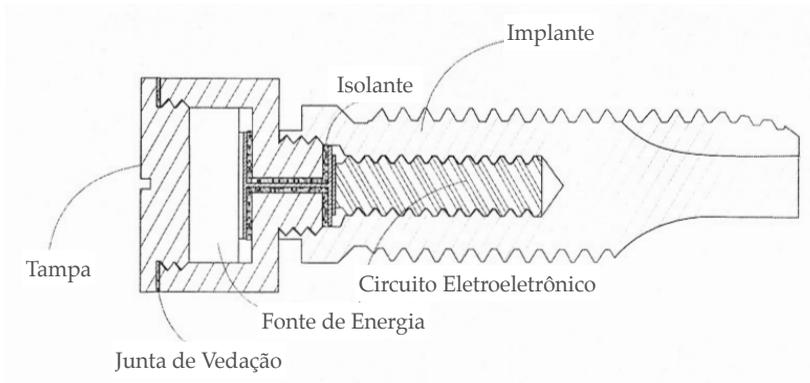
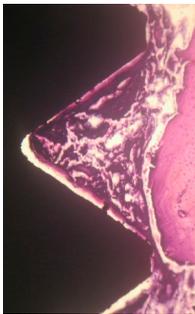


Figura 2 – Desenho do implante associado ao dispositivo elétrico

Figura 3 – Dispositivo elétrico instalado dentro dos implantes de titânio

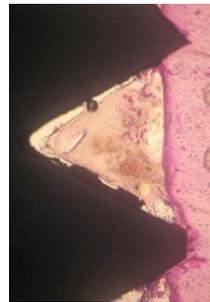
Figura 4 – Lâminas de histologia em 100 x, no período de 7 dias. Os grupos A e B (10 μ A e 20 μ A) sugerem apresentar um osso imaturo e um princípio de formação de osso. O grupo C (controle) apresenta ausência de formação de osso e infiltrado inflamatório.



Grupo 10 μ A



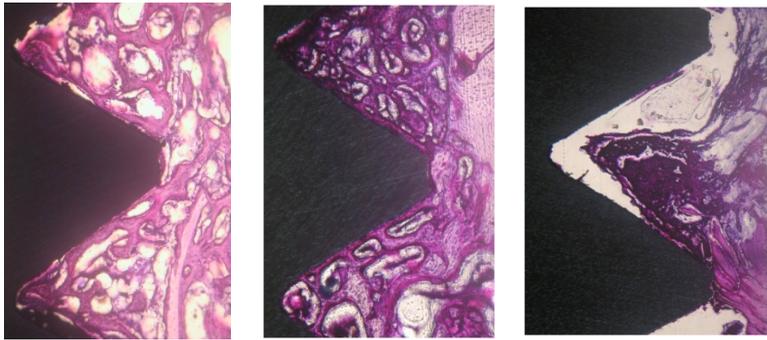
Grupo 20 μ A



Controle

Figura 5 – Lâminas de histologia em 100 x, no período de 15 dias. Os grupos teste A (10 μ A) e B (20 μ A) apresentam maior contato

osso/implante, assim como área de formação óssea maior que o grupo controle (C) ($P < 0,01$).



Grupo 10 μA

Grupo 20 μA

Controle

2.1.10 Tabelas e gráficos

Tabela 1 – Resultado da mensuração do contato entre osso e implante no período de 15 dias

Grupo	Média	Desvio Padrão	N
A – 10 μA	510,45	143,73	15
B – 20 μA	624,39	68,69	15
C – Controle	366,46	141,26	15

Os grupos apresentaram diferenças estatísticas significantes entre si ($p < 0,01$).

Tabela 2 - Resultado da mensuração da área do osso periférico no período de 15 dias

Grupo	Média	Desvio Padrão	N
A – 10 μA^*	24.269,70	10.953,08	15

B – 20 μ A**	44.751,68	15.304,34	15
C – Controle*	18.490,84	7.139,48	15

* Menor contato da área do osso periférico.

** Maior contato da área do osso periférico.

Quando comparadas as áreas do grupo A (10 μ A) e do grupo C (controle), não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Grafico 1.

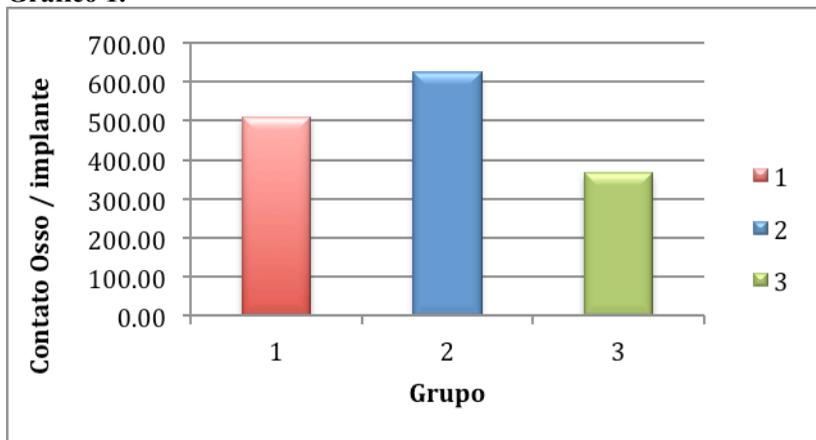
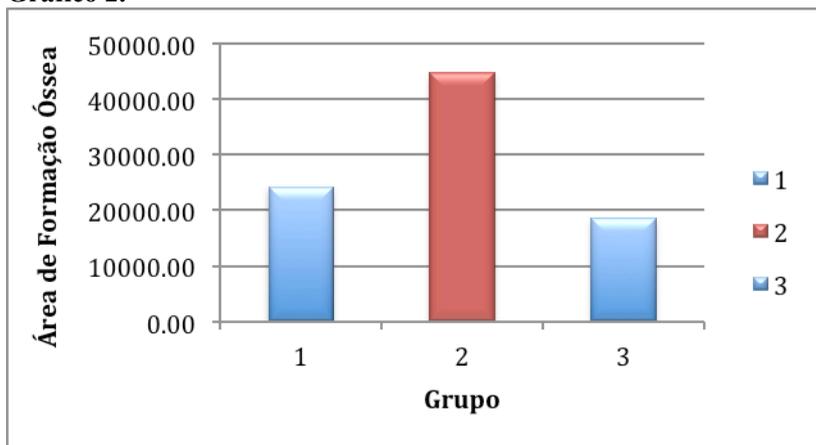


Grafico 2.



3 ARTIGO II – VERSÃO EM INGLÊS

EVALUATION OF THE BONE FORMATION IN TITANIUM MACHINED IMPLANTS ELECTRICALLY STIMULATED: STUDY IN DOGS

3.1 ABSTRACT

Objective: Measure the contact bone/implant which was stimulated through an amplitude of direct electric current (DC) of 10 μA and 20 μA , in a period of 7 and 15 days. The study was accomplished in dogs.

Materials and methods: It was inserted in six Beagle dogs: 90 titanium implants with machined-surface. The animals were divided randomly in two evaluation times: 7 and 15 days (3 animals per time), and a group of implants was inserted in each of their paws. For group A: 10 μA , B: 20 μA and C: control.

Results: The analysis of variance (ANOVA) and Tukey test for multiple comparisons and significance level of 5% ($p < 0.05$). For the group of seven days had no statistical differences, for the groups 15 days showed significant differences between them, either when evaluated contact bone/implant and bone area ($p < 0.01$). Except when comparing the bone areas of group A (10 μA) and group C (control), which showed no statistical difference ($p > 0.05$).

Conclusion: The electrical stimulation associated to the dental implants when receiving electric stimuli, can generate greater contact bone/implant, as can bone formation when compared with those which do not use this stimulus.

Keywords: Titanium implant. Electrical stimulation. Bone formation. Direct current.

3.1.2 Introduction

The osseointegration is defined as the structural and functional direct contact between the healthy and organized bone with the implant surface¹. The required time for one implant to become functional, depends of the quantity of the implant/bone contact, and also of its capacity in resisting to the incident forces upon it². The literature

reports the average period of osseointegration is approximately four months in the maxilla and two months in the mandible ⁵.

The development of new techniques in order to accelerate the bone formation, and as consequence shorten the latent period of the implants, which have resulted in making them suffer different modifications on their micro and macro structure.

Different surface treatments have been accomplished with the purpose of altering the titanium microtopography, for instance: acid etching ⁴, plasma spray ⁵, nitrous oxide ⁶, calcium phosphate or combinations of these treatments ⁶. This texture induces the platelets to release growing factors (PDGF) ⁷ and improve the osteogenesis ^{8,9}. The modification of the implant surface is important in the speed of the bone apposition, once this modification influences in its surface energy and "wettability" (hydrophilicity) ¹⁰. The hydrophilicity influences the level of contact of a biomaterial with the cells within the tissue where it is inserted. Therefore, the increase of the hydrophilicity promotes greater interaction between the implants and the biological environment ¹¹.

Many studies have been carried out in order to try to explain the influence of the surface energy of the titanium on the cellular behavior ¹². The theory most widely accepted is that these properties have a selective effect on the configuration and conformation of the proteins which are adsorbed about the substratum, also considering that they are important during the cell adhesion ¹³⁻¹⁵.

One alternative for these osteoinductive biochemical therapies is the biophysics, such as the mechanics, sonics, and electrics ¹⁶. This last one is applied in the orthopedics as treatment of refractory fracture or deficiency consolidation; furthermore, it began in 1841, with Hartshorne ¹⁷, who described a treatment to the fractures through electric shocks.

More than 100 years later, the electrical stimulation was retaken by description of the potentials piezoelectric, which were generated by the mechanical stress on the crystal structure of the bone ^{18,19}. Authors suggest the *stress* in the crystalline components of the bone produce a current, in which triggers a cicatrization process ¹⁹.

More recently, several authors ²⁰ have demonstrated that similar electric signals to the ones generated by bone *stress* mechanisms can actually improve the fracture cicatrization. The central hypothesis in the application of physical forces as the ones generated by electric potentials is the regulation of cell signaling in the bone formation; Taking into consideration, the idea that these electric fields have influenced the repair process ^{21,22} in a very important way.

The electrical stimulation, which depends on the kind of nature signals provided, can be classified in three groups: inductive stimulation, capacitive stimulation and direct current stimulation.

In this study an electrical stimulation of direct current (DC) was used; moreover, this is an invasive method where is applied an electric field through the surface on which the cells are expected to grow, or indirectly through a way that they are growing indeed²³. Have been applied different current fixed parameters²⁴ that reach from 1 to 50 μA ; which may influence the proliferation of osteoblasts²⁴ the same way as markers of differentiation and bone expression²⁵.

This work presents the application of a direct electric current (DC), associated with the dental implants as a manner of potentiating the bone formation and also reduce the necessary time, so there will be osseointegration.

3.1.3 Material and method

3.1.3.1 Ethical considerations

The protocols for animal experimentation described in this article were approved by the Animal Ethics and Research Committee of Health Sciences University of Santa Catarina, Brazil; all the animal experiments adhered to the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals of the university, which received the approval under concept # 114/CEUA/ PRPe/2008.

3.1.3.2 Methodology

Ninety titanium implants with 6.0 mm of diameter per 11.5 mm of length, with machined-surface and sterilized by gamma rays were made.

Six male Beagle dogs approximately 12 months old and weighing about 15 kg were used.

For the execution of surgical intervention, the animals were divided randomly in two evaluation times: 7 and 15 days (3 animals per time), in each one of it legs was placed the same group of samples and each leg was random Thus, the distribution of the groups concerning the variable type per animal was the following:

Time 1: 7 days, 3 animal for the group

a) 5 implants with electric device with 10 μA ;

- b) 5 implants with electric device with 20 μ A;
- c) 5 implants without electric device.

Time 2: 15 days, 3 animal for the group

- a) 5 implants with electric device with 10 μ A;
- b) 5 implants with electric device with 20 μ A;
- c) 5 implants without electric device.

3.1.3.3 Electric device

The electric device is formed by a battery (energy source) and an electronics circuit able to transmit a direct electric current and continues from 10 μ A or 20 μ A within a dental implant. (Figure 1, 2, and 3).

3.1.3.4 Anesthesia and surgical procedure

Before the surgical procedure, each dog received an intramuscular injection of atropine sulfate 0.50 mg (Atropinon[®], Hipolabor Farmacêutica Ltda., Sabará, MG, Brazil) containing a dosage of 0.44 mg/kg. After 10 minutes, xylazine was applied (Rompun[®], Bayer S. A., São Paulo, SP, Brazil), containing a dosage of 3 mg/kg, and ketamine 1.0 mg (Francotar[®], Virbac, Saúde Animal, São Paulo, SP, Brazil), with a 16 mg/kg dosage, both through intramuscular via, in just a single injection.

When necessary, anesthesia with half of the parent-dose was given. A longitudinal incision on the tibia was made, in order to expose the underlying osseous tissue. The implants were inserted making use of diameter series cutters, under refrigeration through constant irrigation with saline at room temperature, until it has reached the implant diameters. The implants and the electric devices were applied according to the groups. The accesses were sutured in two plans, with 5.0 resorbable Vicryl thread (Ethicon-Vicryl[®], Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brazil) internally and with 4.0 nylon thread (Somerville[®], Pernambuco, Brazil).

The animals were induced to a painless death (MII), according to the predetermined evaluation times, which happened through an administration of a lethal dose of sodium thiopental (Thionembutal[®]) anesthetic.

3.1.4 Histological evaluation

The pieces were dissected and blocks which contained the samples were obtained and kept in 10% formalin solution for 24 hours; afterwards, they were washed with running water and gradually dehydrated serially in 50 - 100% alcoholic solutions. After the dehydration, the samples were soaked in methacrylate based resins (RL – White) according to the manufacturer recommendations.

After the polymerization, the blocks were sectioned in the long axis of the implant in the same medial portion (Exact Apparatebau GmbH & Co., Norderstedt, Germany). Then the samples were reduced for wearing on abundant irrigation with running water to a thickness of 50 μm (Exact Apparatebau GmbH & Co., Norderstedt, Germany).

Following, the blades were stained with Toluidine blue (Merck) and Acid fuchsin (Merck).

The images were obtained through an optical microscope, which also has an incorporated camera, with the extension of 100 x (Leica IC50 HD, Microsystems & Switzerland). The sequence of images were grouped with the help of a specific software (Leica Aquire Mac). The analysis and measurement of the contact bone/implant, and the bone area were performed in the Axio Vision program (Carl Zeiss, Germany).

3.1.5 Statistical analysis

The variance analysis (ANOVA) and the test of Tukey multiple comparisons were made. A level of significance 5% ($p < 0.05$) was adopted.

3.1.6 Results

Following the method proposed, the results were that the group of 7 days did not have statistical differences (Figure 4) between both the group of 15 days, groups with electrical stimulus (10 μA to 20 μA) showed a significant increase contact the bone/implant and the bone area (Figure 5) than the group without stimulation ($p < 0.05$) (Table 1 and Graph 1). Except when comparing the areas of group A (10 μA) and group C (control), which showed no statistical difference ($p > 0.05$) (Table 2 and Graph 2).

3.1.7 Discussion

The healing acceleration time by means of electric stimuli with animal studies is still a controversial matter. Such stimulation depends

of the distribution method of signals. In studies done by Shigino and collaborators, in 2000²⁶ and in 2001²⁷, they evaluated the bone formation by means of capacitive stimuli (CS), associated to the dental implants in dogs' mandible; as a result, it was observed that there was a significant increase on the contact bone/implant and bone area when compared with the control group. Nevertheless, Shafer and collaborators²⁸, they assessed the effect of the electric stimulation (DC) in 1995, which was transmitted by an external signal of 7.0 μA , in the osseointegration of dental implants inserted in the rabbits' mandibles. The authors have concluded, this signal method with such a magnitude does not foster bone growth. Shayesteh and collaborators²⁹ in 2007, inserted implants in dogs' mandibles associated to an external electrical signal of 20 μA ; in addition to, the authors suggest the electricity can stimulate bone formation around dental implants.

Matsumoto and collaborators³⁰ examined the influence of inductive stimulation application (PEMF) in 2000, in the bone around the dental implants inserted in rabbits' femurs; the previous researchers suggested this type of stimuli can promote bone growth around the dental implants; however, they state that to select a proper intensity and duration of the electrical impulse, as well as the treatment period is very important. This research used a direct current (DC) due to the fact this method needs to be in direct contact with the bone so the implant becomes a cathode; furthermore, the anode gets exposed in the oral cavity and the surrounding tissues help as a way to close the circuit, in order to allow the flow of electric current²⁴. The mechanism of action behind this stimulation (DC) involves upregulation of a number of osteoinductive factors, which are normal physiologic regulators of bone formation. The electrochemical reactions that occur at the cathode also contribute to the mechanism of action of DC stimulation³¹. Around the cathode reactions where there suggests that there is a decrease in oxygen concentration, increasing the pH to produce hydroxyl radicals, according to the following equation: $\text{O}^-\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + 4\text{e}^- \rightarrow 4\text{OH}^-$ ^{23, 31, 32}. This low tissue oxygen tension is conducive to increased osteoblastic activity, while the alkaline environment favors the activity of osteoblasts and decreases osteoclastic activity. Additionally, hydrogen peroxide stimulates macrophages to release vascular endothelial growth factor (VEGF), which is an angiogenic factor crucial for fracture healing³³. Direct current stimulation (DC) is suggested upregulate mRNA for osteoinductive growth factors such as BMP -2, -6, -7 which are known to stimulate bone and cartilage cell proliferation, differentiation, and extracellular matrix synthesis^{34, 35}.

Other noninvasive techniques are also used for bone healing, as the case of capacitive stimulation (CS) and inductive stimulation (PEMF), between both, the first need for high voltages and frequencies, and these factors can cause irritation at the site stimulated²⁴. For the second need is great equipment and space for your application^{15, 16}.

The literature shows different types of periods and current amplitudes to be studied, which are the same from one week until three months. This work is based on the specific stages of bone healing in dogs which correlated with rates of bone repair in humans³⁶. The bone reorganization can be divided in activation, active reabsorption, latency and formation. The reorganization begins with a phase of activation which lasts hours or days followed by bone reabsorption through osteoclasts. This reabsorption period endures for 10 days in dogs and for 14 days in humans. The latency phase has approximately one week duration in dogs and from one to two weeks in humans. In this phase, the osteoclasts are replaced by osteoblasts, as a result, the bone neoformation phase begins. The osteoid matrix reaches the surface of implant in the fourth week in dogs and in the sixth week in humans. The resulting cavity of reabsorption is filled by bone tissue after approximately two months and half in dogs and three months in humans. The experimental periods chosen in this research were 7 and 15 days. Therefore the moment of implant insertion corresponds to the 0 period. The reabsorption period corresponds to seven days, which, in humans would correspond to an intense cellular activity where would happen the migration of new capillaries into the clot (angiogenesis); for this reason is possible to explain that there was not any statistical differences in the study of the test group and the control group of seven days. However, in the group without electrical stimulation was observed greater inflammatory infiltrate than in the experimental group. The reabsorption period and latency phase of the bone reorganization cycle correspond to 15 days, which in humans correspond to a coalescence phase of osteoid islands which are individuals to the surface; so the clinical implant consolidation is generated and increased when the electrical stimuli were made. This research shows that the test groups had a statistical difference, in other words, the contact bone/implant and bone area were greater than in the control group.

Different current amplitudes have been applied for the bone formation, for instance the direct current (DC) of 7 μA - 50 μA ¹⁶. Nevertheless, bone necrosis has been reported when is used a high dose of electric current^{37, 38}. This work used 10 μA to 20 μA magnitudes once the literature reports that when both are used have promoted

greater bone growth. Hagiwara and Bell ³⁹ analyzed (in 2000) if the use of 10 μA electric stimulation (DC) during the mandibular lengthening accelerates a new bone formation. The results indicated that this stimulus during the gradual distractibility can shorten the total elongation duration. El-Hakim and collaborators ⁴⁰ used a direct current (DC) in 2004, and they tested the effect of this current in the distraction osteogenesis during the different phases; so the results displayed synergism when this stimulus was applied in the distraction zone during the activation or consolidation, and this stimulus can shorten the total elongation time, as well as the (bone) distractor can be removed before the cicatrization. In 1977, Brighton and collaborators ⁴¹ used DC from 10 μA to 20 μA in the treatment impaired fracture healing in 57 patients.

The outcomes show that 39 of the 57 patients were cured, which suggests that the specific electrical parameters are necessary for the osteogenic stimulation in order to be successful in the patients treatment. This study along with the animal researches determined the 20 μA preference in the direct current (DC).

There are not many researches which evaluate the direct current associated to the dental implants, due to the fact of the size/space limitations on time to confect a device within the dental implant. In this study was found the solution for the previous problem which was to increase the implant diameter; however this size of implant is rarely used clinically, it was only used in this research with the purpose of observing if this type of electric device influences in bone growth. As a result, this work objective was achieved successfully as presented here. In 2009, Song and collaborators ⁴² used a BEC stimulator, which consists in a biphasic waveform pulse similar to the one used in the PMFE; in addition, this stimulator has a current amplitude of 20 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ which was inserted immediately after the installation of the implant surgery. One week later the stimulator was removed and replaced by a healing device; the samples were obtained 2 and 4 weeks later. Different from this study that uses a direct current (DC) with two current amplitudes (10 μA and 20 μA), which were placed following the implant installation and kept during all the evaluation period. Nevertheless the results of both researches are similar, taking into consideration that the groups with electric stimulus presented greater contact bone/implant and bone area, than the control groups. In 2011, on the other hand Dergin and collaborators ⁴³ did another study, which used a micro-stimulator of 7.5 μA direct current (DC) associated to the dental implants inserted in the sheep's tibias. After 1, 2, and 3 months, the

authors evaluated the contact and bone formation in osseointegration and did not find any evidence with this amplitude of current aid.

The electric stimuli were used in the most of the different samples, as well as their distribution and signal amplitude due to the fact of influencing in the proliferation, differentiation and expression of bone markers. Moreover, the utilization of the electric stimuli have demonstrated not just the increase of the bone formation as can help in bone healing, too. After all previous discussion and the findings presented here and in other researches; finally, the author can suggest the electric stimulation potentiates the bone formation and reduce the cicatrization time. Furthermore, other researches should be done in order to compare this study example with dental implants which are already found in the market. As a consequence, a new implant line can be used in the near future.

3.1.8 Conclusion

The electrical stimulation associated to the dental implants when there are electrical stimuli can generate greater contact bone/implant as well as bone formation when compared to those which do not use this stimulus.

3.1.9 References

Go to see the references to pages 30-33.

3.1.10 Pictures

Figure 1 – Drawing of the electric device

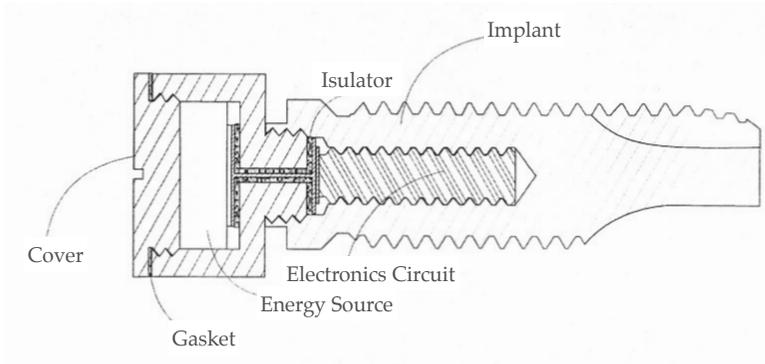


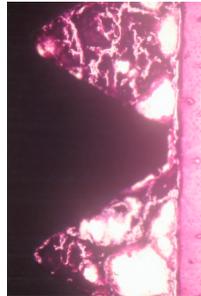
Figure 2 – Drawing of the implantation associated with the electric device

Figure 3 – Installed electric device insided of the titanium implants

Figure 4 – Histology slides at 100 x, in a seven-day period. The A and B groups (10 μ A and 20 μ A) present an immature bone as well as a principle of bone formation. The C (control) group presents absence of bone formation and inflammatory infiltrate.



Group A – 10 μ A

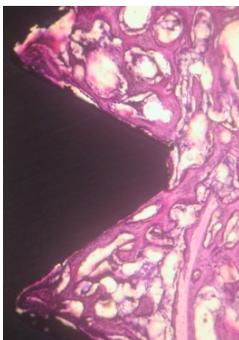


Group B – 20 μ A



Control

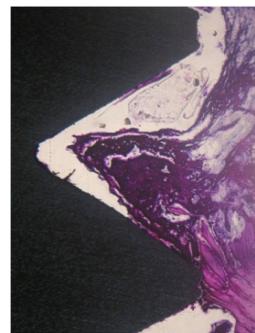
Figure 5 – Histology slides at 100 x, in a 15-day period. The A (10 μ A) and B (20 μ A) test groups have presented greater contact bone/implant as well as area of bone formation greater than the control group (C) ($P = 0.01$).



Group A – 10 μ A



Group B – 20 μ A



Control

3.1.11 Tables and graphs

Table 1 – Results of measurement of the contact bone/implant in the period of 15 days

Group	Mean	Std Dev
A – 10 μ A	510.45	143.73
B – 20 μ A	624.39	68.69
C – Control	366.46	141.26

The groups with electrical stimulation (10 μ A to 20 μ A) showed a significant increase contact the bone/implant ($p < 0.01$).

Table 2- Results of the measurement of peripheral bone area

Group	Mean	Std Dev
A – 10 μ A*	24,269.70	10,953.08
B – 20 μ A**	44,751.68	15,304.34
C – Control*	18,490.84	7,139.48

* Lower contact of the bone area.

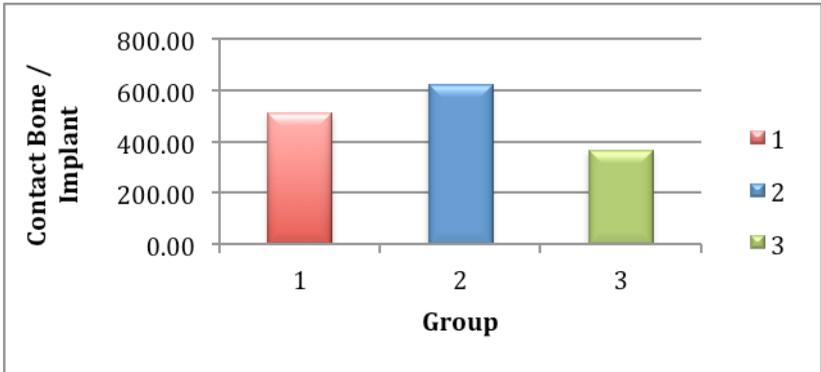
** Greater of the bone area.

When comparing the areas of group A (10 μ A) and group C (control), which showed no statistical difference ($p > 0.05$).

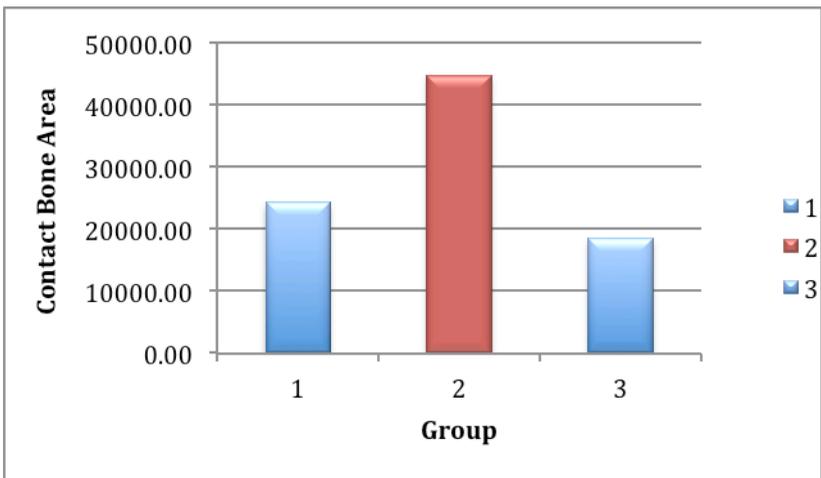
Graph 1 –

Graph 2 –

Graph 1.



Graph 2.



4 BIBLIOGRAFIA

AARON, R.; CIOMBOR, D.; WANG, S.; SIMON, B. Clinical biophysics: the promotion of skeletal repair by physical forces. **Ann NY Acad Sci.** 2006;1068:513-31.

ALBREKTSSON, T. A. Multicenter report on osseointegrated oral implants. **J Prosthet Dent.** 1988, v. 60 (1), p. 75 – 84.

BAIER, R. E.; MEYER, A. E. Implant surface preparation. **Int. J. Maxillofac. Impl** 1988,3,1:9-20.

BARQUERO CORDERO, Ernesto. **Avaliação do torque de remoção na interface osso-implante promovido por estímulo elétrico em implantes dentários: estudo em cães.** 2009. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BASSETT, C. A. L.; BECKER, R. O. Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. **Science.** 1962;137:1063-4.

BLACK, J. **Electrical stimulation: its role in growth, repair, and remodeling of the musculoskeletal system.** 1987. New York: Praeger Publishers.

BOYAN, B. D.; HUMMERT, T. W.; DEAN, D. D.; SCHWARTZ, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. **Biomaterials.** 1996,17,2:137-146.

BRIGHTON, C. T.; BLACK, J.; FRIEDENBERG, Z. B.; ESTERHAI, J. L.; DAY, L. J.; CONNOLLY, J. F. A multicenter: study of the

treatment of nonunion with constant direct current. **J Bone Joint Surg Am.** 1981;63:2-13.

BRIGHTON, C. T.; WANG, W.; SELDES, R.; ZHANG, G.; POLLACK, S. R. Signal transduction in electrically stimulated bone cells. **J Bone Joint Surg Am.** 2001. 83:1524 – 1523.

BUCH, F.; ALBREKTSSON, T.; HERBS, T. Direct current influence on bone formation in titanium implants. Abstract. **Biomaterials.** 1984 Nov;5(6):341-6.

BUCH, F.; ALBREKTSSON, T.; HERBS, T. The Bone Chamber for quantification of electrically induced osteogenesis. **J Orthop Res.** 1986;4(2):194-203.

BUSER, D.; SCHENK, R. K.; STEINEMANN, S.; FIORELLINI, J. P.; FOX, C. H.; STICH, H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants a histomorphometric study in miniature pig. **J Biomed Mater Res.** 1991, 25 (7): 889 – 902.

DAVIES, J. E. Mechanisms of endosseous integration. **Int. J. Prosthodont.** 1998; v.11, n.5.

DAVIES, J. E. Understanding Peri-Implant Endosseus Healing 2005. Re-issued from: **J Dent Educ.** 2003. V 67, n 8: 932-949.

DAVIES, J. E. Bone bonding at natural and biomaterial surface. **Biomaterials** 2007. 28: 5058– 5067.

DEGASNE, I.; BASLE, M. F.; DEMAIS, V.; HURE, G.; LESOURD, M.; GROLLEAU, B.; MERCIER, L.; CHAPPARD, D. Effects ou roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading and

proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. **Calcif. Tissue Int.** 1999, 64, 6: 499-507.

DELIGIANNI, D. D.; KATSALA, N.; LADAS, S.; SOTIROPOULOU, D.; AMEDEE, J.; MISSIRLIS, Y. F. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and protein adsorption. **Biomaterials.** 2001,22,11:1241-1251.

DERGIN, G.; AKTAS, M.; GÜRSOY, B.; KÜRKÇÜ, M.; DEVECIOGLU, Y.; BENLIDAY, E. Direct Current Electric Stimulation in Implant Osseointegration: An experimental animal study with sheep. **J Oral Implantol.** 2011, 21.

ELLINGSEN, J. E. Surface configurations of dental implants. **Periodontol** 2000.1998., v.17: 36-46.

Fred R. T. NELSON, MD; Carl T. BRIGHTON, MD, PhD; James RYABY, PhD; Bruce J. SIMON, PhD; Jason H. NIELSON, MD; Dean G. LORICH, MD; Mark BOLANDER, MD, PhD; John SEELIG, MD. Use of physical forces in bone healing. **J Am Acad. Orthop. Surg.** 2003,11:344 – 354.

FRIEDENBERG, Z. B.; BRIGHTON, C. T.; MICHELSON, J. D.; BEDNAR, J.; SCHMIDT, R.; BROCKMEYER, T. The effects of demineralized bone matrix and direct current on an "in vivo" culture of bone marrow cells. **J Orthop Res.** 1989;(7):22-7.

FUKADA, E.; YASUDA, I. On the piezoelectric effect of bone. **J Phys Soc Japan.** 1957;12:1158-62.

GOTTLANDER, M.; JOHANSSON, C. B.; WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T.; RADIN, S.; DUCHEYNE, P. Bone tissue reactions to an electrophoretically applied calcium phosphate coating. **Biomaterials** 1997;18(7):551-7.

HARTSHORNE, E. On the causes and treatment of pseudarthrosis and especially the form of it sometimes called supernumerary joint. **Am J Med.** 1841;1:121-56.

JUFIN, R. A.; BERMAN, C. L: The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: A 5-year analysis. **J Periodontol.** 1991, 62:2.

KILPADI, D. V.; WEIMER, J. J.; LEMONS, J. E. Effect of passivation and dry heatsterilization on surface energy and topography of unalloyed titanium implants. **Colloids and Surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects** 1998. v.135, p.89-101.

KLINGER, A.; STEINBERG, D.; KOHAVI, D.; SELA, N. Mechanism of adsorption of human albumin to titanium in vitro. **J. Biomed. Mater. Res.** 1997,36, 3: 387-392.

KORENSTEIN, R.; SOMJEN, D.; FISCHLER, H.; BINDERMAN, I. Capacitative pulsedelectric stimulation of bone cells: induction of cyclic-AMP changes and DNA synthesis, biochim. **Biophys. Acta** 803. 1984:302-7.

LAMPIN, M.; WAROCQUIER-CLEROUT, R.; LEGRIS, C.; DEGRANGE, M.; SIGOT-LUIZARD, M. F. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion and cell migration. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.36, n.1, p.99-108, 1997.

LENTE, R. W. Cases of un-united fracture treated by electricity. **New York State J Med.** 1850;5:317-9.

NAYAB, N.; JONES, H.; OLSEN, I. Effects of calcium ion implantation on human bone cell interaction with titanium. **Biomaterials.** 2005,26: 4717-4727.

ORSINI, G.; ASSENZA, B.; SCARANA, A.; PIATELLI, M.; PIATELLI, A. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2000, 15:779-784.

PULEO, D. A.; BIZIOS, R. Mechanisms of fibronectin-mediated attachment of osteoblasts to substrats in vitro. **Bone Miner**. 1992, v.18, n.3, p.215-226.

PULEO, D. A.; NANCI, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. **Biomaterials**. 1999, 20: 2311–2321.

RUBINACCI, A.; BLACK, J.; BRIGHTON, C. T.; FRIEDENBERG, Z. B. Changes in bioelectric potentials on bone associated with direct current stimulation of osteogenesis. **Journal Orthopaedic Research**. 1988;6:335-45.

SCHWARTZ, Z.; SIMON, B. J.; DURAN, M. A.; BARABINO, G.; CHAUDHRI; BOYAN, B. D. Pulsed electromagnetic fields enhance BMP-2 dependent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. **J Orthop Res**. 2008. 26: 1250 – 1255.

SHAFER, D. M.; ROGERSON, K.; NORTON, L.; BENNETH, J. The effect of electrical perturbation on osseointegration of titanium dental implants: a preliminary study. **J Oral Maxillofacial Surgery**. 1995;53:1063-8.

SHAYESTEH, Y. S.; ESLAMI, B.; DEHGHAN, M. M.; VAZIRI, H.; ALIKHASSI, M.; MANGOLI, A. et al. The effect of a constant electrical field on osseointegration after immediate implantation in dog mandibles: a preliminary study. **Journal of Prosthodontics**. 2007 Sep-Oct;16(5):337-42.

SHIGINO, T.; OCHI, M.; HIROSE, Y.; HIRAYAMA, H.; SAKAGUCHI, K. Enhancing osseointegration by capacitively coupled electric field: a pilot study on early occlusal loading in the dog mandible. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2001;16:841-50.

SHIGINO, T.; OCHIO, M.; SAKAGUCHI, H.; SAKAGUCHI, K.; NAKADE, O. Application of capacitively coupled electric field enhances periimplant osteogenesis in the dog mandible. **Int J Prosthodontic**. 2000;13:365-72.

SONG, J.; Tae H. CHO; Hui PAN; Yoon M. SONG; In S. KIM; Tae H. LEE; Soon J. HWANG; Sung J. KIM. An Electronic Device for Accelerating Bone Formation in Tissues Surrounding a Dental Implant. **Bioelectromagnetics** 2009; 30: 374 – 384.

UITTO, V. J.; LARJAVA, H.; PELTONEN, J.; BRUNETTE, D. M. Expression of fibronectin and integrins in cultured periodontal ligament epithelial cells. **J. Dent. Res**. 1992, 71, 5:1203-1211.

WANG, Z.; CLARK, C. C.; BRIGHTON, C. T. Up-regulation of bone morphogenetic proteins in cultured murine bone cells with use of specific electric fields. **J Bone Joint Surg Am**. 2006. 88:1053-1065.

YAMAGAMI, A.; YOSHIHARA, Y.; SUWA, F. Mechanical and histologic examination of titanium alloy material treated by sandblasting and anodic oxidization. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2005, 20:48:53.

YASUDA, I. Fundamental aspects of fracture treatment. **J Kyoto Med Soc**. 1953.;4:395-406.

5 METODOLOGIA EXPANDIDA

O presente estudo foi submetido à análise do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, recebendo aprovação sob o parecer nº 114/CEUA/PRPe/2008.

5.1 CONFECÇÃO DOS IMPLANTES

Foram compradas da empresa Sandinox – Biometais barras de titânio comercialmente puro, segundo ASTM F67 Gr. 2/ ISO 5832-2, superfície retificada, livre de fase alfa e inclusões de tolerâncias h9, em comprimentos de fabricação de cerca de 3,2 metros, fabricadas nos Estados Unidos. Os implantes dentários foram usinados com diâmetro de 6,0 mm e comprimento de 11,5 mm.

A limpeza dos implantes obedeceu à seguinte sequência:

- Lavar os implantes com detergente neutro e água destilada, na cuba de ultrassom (2 vezes por 10 minutos cada ciclo);
- Lavar com água destilada na cuba de ultrassom (1 ciclo);
- Secar em estufa a 60°.

A passivação seguiu as normas ASTM 86, na seguinte ordem:

As peças foram colocadas em um recipiente de vidro com ácido sulfúrico 10% por 10 minutos, em seguida foram colocadas em um recipiente com água destilada por 10 minutos, posteriormente realizou-se um ciclo de ultrassom com água destilada, as peças foram secadas em estufas e embaladas para ser esterilizadas. A esterilização foi feita mediante raios gama pela empresa C. B. E., Cotia, Brasil.

5.2 DISPOSITIVO ELÉTRICO

O dispositivo elétrico é formado por uma bateria (fonte de energia) e um circuito eletroeletrônico capaz de fazer circular uma corrente elétrica contínua e constante. Foram confeccionados dois tipos de dispositivo, o primeiro para uma amplitude de sinal nominal de 10 μA e o outro para 20 μA (Figura 1). Primeiramente eles foram analisados em uma bancada de teste com ajuda de um multímetro, ferramenta que mede os valores de corrente elétrica; posteriormente, foram colocados dentro de um implante dentário (Figuras 2 e 3).

Figura 1 – Corte longitudinal do desenho do dispositivo elétrico acoplado ao implante de titânio

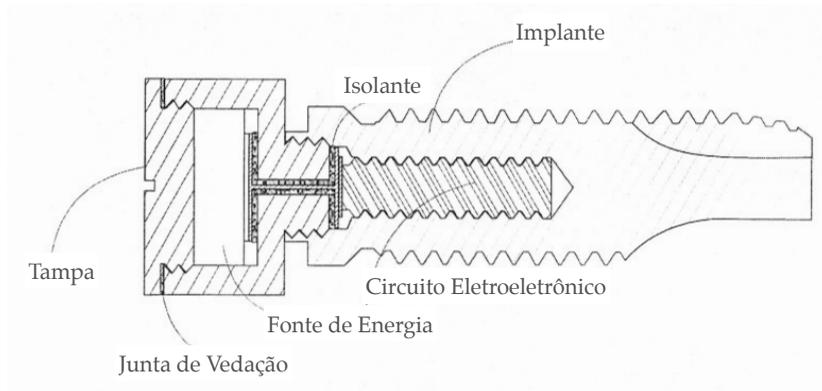


Figura 2 – Desenho da bancada de teste

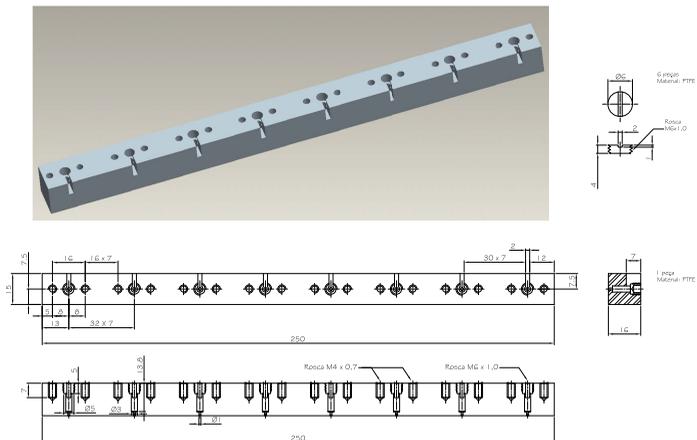
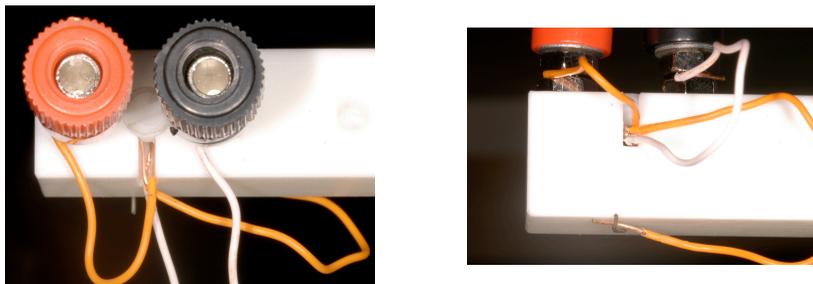


Figura 3 – Bancada de teste onde foram medidos os valores nominais das diferentes amplitudes



5.3 METODOLOGIA

Seis cães machos da raça *Beagle*, com aproximadamente 12 meses de idade e peso aproximado de 15 kg, foram utilizados.

Para a realização da intervenção cirúrgica, os animais foram divididos aleatoriamente em dois tempos de avaliação, de 7 e 15 dias (3 animais por tempo), em cada uma de suas patas foi colocado o mesmo grupo de amostras e cada pata foi casualizada. Assim, a distribuição dos grupos em relação ao tipo de variável por animal foi a seguinte:

Tempo 1: 7 dias, 3 animais por grupo

- A. 5 implantes com dispositivo elétrico com 10 μ A;
- B. 5 implantes com dispositivo elétrico com 20 μ A;
- C. 5 implantes sem dispositivo elétrico.

Tempo 2: 15 dias, 3 animais por grupo

- A. 5 implantes com dispositivo elétrico com 10 μ A;
- B. 5 implantes com dispositivo elétrico com 20 μ A;
- C. 5 implantes sem dispositivo elétrico.

5.4 ANESTESIA E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Antes do procedimento cirúrgico, cada cão recebeu uma injeção, por via intramuscular, de sulfato de atropina 0,50 mg (Atropinon[®], Hipolabor Farmacêutica Ltda., Sabará, MG, Brasil), na dosagem de 0,44 mg/kg. Após 10 minutos, foram aplicados xilazina (Rompun[®], Bayer S. A., São Paulo, SP, Brasil), na dosagem de 3 mg/kg, e cloridrato de quetamina 1,0 mg (Francotar[®], Virbac, Saúde Animal, São Paulo, SP,

Brasil), na dosagem de 16 mg/kg, ambos por via intramuscular, em uma única injeção. Em casos de necessidade, fez-se reforço anestésico com a metade da dose-mãe. Realizou-se uma incisão longitudinal sobre a tíbia para expor o tecido ósseo subjacente (Figura 3). Os implantes foram instalados utilizando-se fresas de diâmetros seriados, sob refrigeração por irrigação constante com soro fisiológico à temperatura ambiente, até atingir o diâmetro dos implantes (Figura 4). Instalaram-se os implantes e os dispositivos elétricos conforme os grupos (Figuras 5, 6 e 7). Os acessos foram suturados em dois planos (Figuras 8-A e 8-B), internamente com fio Vicryl reabsorvível 5.0 (Ethicon-Vicryl[®], Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) e externamente com fio de náilon 4.0 (Somerville[®], Pernambuco, Brasil).

Os animais foram levados a uma morte indolor induzida (MII), seguindo os tempos de avaliação predeterminados, por administração de dose letal de anestésico tiopental sódico (Thionembutal[®]).

Figura 3 – Incisão longitudinal realizada na tíbia do cão



Figura 4 – Sequência de perfurações prontas para a colocação dos implantes



Figura 5 – Colocação de implante

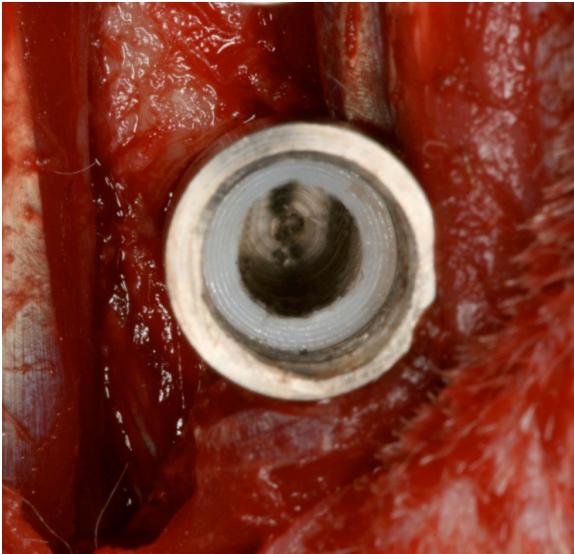


Figura 6 – Dispositivo elétrico instalado

Figura 7 – Implantes instalados já com os parafusos de cobertura



Figura 8 – Fechamento do acesso cirúrgico do periósteo (A) e da pele (B)



(A)



(B)

5.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

As peças foram dissecadas e blocos com as amostras foram obtidos e mantidos em solução de formalina 10% por 24 horas, posteriormente lavados em água corrente e gradualmente desidratados seriadamente em soluções alcoólicas 50 - 100%. Após a desidratação, as amostras foram embebidas em resinas à base de metacrilato (Technovit – 7200) de acordo com as recomendações do fabricante. Depois da polimerização, os blocos foram seccionados ao longo do eixo do implante, em sua porção medial (Exakt Apparatebau GmbH & Co.,

Norderstedt, Alemanha), e, em seguida, as amostras foram reduzidas por desgaste, sob abundante irrigação com água corrente, até uma espessura de 50 μm (Exakt Apparatebau GmbH & Co., Norderstedt, Alemanha). Posteriormente as lâminas foram coradas com azul de toluidina (Merck) e fucsina ácida (Merck).

As imagens foram obtidas através de um microscópio ótico com uma ampliação de 100 x (Leica IC50 HD, Microsystems & Switzerland), o qual possui uma máquina fotográfica incorporada. A sequência de imagens foi agrupada com o auxílio de um *software* específico (Leica Aquire Mac). A análise e mensuração do contato entre osso e implante e da área de osso foram realizadas no programa Axio Vision (Carl Zeiss, Alemanha).

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo
PP00205

Título
Aumento da osteogênese por estímulo elétrico gerada em implantes dentários de titânio, através da agregação de placas SMD.

Resultado:
Aprovado

Considerações

Ofício nº 114/CEUA/PRPe/2008

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Ricardo de Souza Magini, Departamento de Estomatologia – CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:
– APROVADO, por 2 (dois) anos, para a utilização de 6 cães (*Cannis familiaris*).

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)
Data 05/12/2010**

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE

