

DAVI REIS CALDERONI

AVALIAÇÃO DO USO DE PLACAS SINTERIZADAS DE TITÂNIO COM E SEM RECOBRIMENTO DE β-FOSFATO TRICÁLCICO NO REPARO DE FALHAS ÓSSEAS EM CALVÁRIA DE RATOS

EVALUATION OF SINTERED TITANIUM SCAFFOLDS WITH AND WITHOUT β-TRICALCIUM PHOSPHATE COATING FOR CALVARIAL DEFECTS REPAIR IN RATS

> CAMPINAS 2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS Faculdade de Ciências Médicas

DAVI REIS CALDERONI

AVALIAÇÃO DO USO DE PLACAS SINTERIZADAS DE TITÂNIO COM E SEM RECOBRIMENTO DE β -FOSFATO TRICÁLCICO NO REPARO DE FALHAS ÓSSEAS EM CALVÁRIA DE RATOS

EVALUATION OF SINTERED TITANIUM SCAFFOLDS WITH AND WITHOUT β-TRICALCIUM PHOSPHATE COATING FOR CALVARIAL DEFECTS REPAIR IN RATS

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences of the University of Campinas as part of the requirements to obtain the degree of Doctor of Sciences.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Kharmandayan CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Ivan Felizardo Contrera Toro

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO DAVI REIS CALDERONI, E ORIENTADO PELO PROF. DR. PAULO KHARMANDAYAN.

> CAMPINAS 2014

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C127a	Calderoni, Davi Reis, 1982- Avaliação do uso de placas sinterizadas de titânio com e sem recobrimento de beta-fosfato tricálcico no reparo de falhas ósseas em calvária de ratos / Davi Reis Calderoni Campinas, SP : [s.n.], 2014.
	Orientador : Paulo Kharmandayan. Coorientador : Ivan Felizardo Contrera Toro. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.
	 Titânio. 2. Osseointegração. 3. Crânio. 4. Próteses e implantes. 5. Anormalidades craniofaciais. I. Kharmandayan, Paulo. II. Toro, Ivan Felizardo Contrera, 1957 III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of sintered titanium scaffolds with and without betatricalcium phosphate coating for calvarial defects repair in rats Palavras-chave em inglês: Titanium Osseointegration Skull Prostheses and implants Craniofacial abnormalities Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica Titulação: Doutor em Ciências Banca examinadora: Paulo Kharmandayan [Orientador] Edna Frasson de Souza Montero Luiz Gonzaga de Freitas Filho Cláudio Saddy Rodrigues Coy João Batista de Miranda Data de defesa: 16-12-2014 Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

DAVI REIS CALDERONI

Orientador (a) PROF(A). DR(A). PAULO KHARMANDAYAN

MEMBROS:	
1. PROF(A). DR(A). PAULO KHARMANDAYAN	Kuell)
2. PROF(A). DR(A). EDNA FRASSON DE SOUZA MONTER	o Granen Vontero
3. PROF(A). DR(A). LUIZ GONZAGA DE FREITAS FILHO	L. Thilly
4. PROF(A).DR(A). CLÁUDIO SADDY RODRIGUES COY_	austin My 4
5. PROF(A).DR(A). JOÃO BATISTA DE MIRANDA	Junio

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 16 de dezembro de 2014

RESUMO

Introdução: A reparação de um defeito craniano é um procedimento desafiador, que requer não somente o preenchimento da falha óssea mas também estabilidade a longo prazo do material empregado e restabelecimento do contorno e simetria. Diversos tipos de materiais com diferentes características bem como diferentes métodos de produção dos implantes vêm sendo testados, sem que ainda haja um substituto ósseo considerado ideal. No presente estudo foram investigadas as propriedades de osseointegração de implantes da liga Ti6Al4V construídos por prototipagem com poros tridimensionalmente conectados considerando a influência do recobrimento dos mesmos com uma camada delgada de β -fosfato tricálcico nestas propriedades.

Método: Trinta ratos foram submetidos à criação de defeitos ósseos bilaterais na calvária, que foram preenchidos com implantes, recobertos ou não com β -fosfato tricálcico, de modo aleatório. Os animais foram distribuídos em grupos e sacrificados 15, 45 e 90 dias após o procedimento. A integração dos implantes foi inicialmente avaliada por ensaio de compressão. A interface osso-implante foi analisada por meio de microscopia eletrônica de varredura.

Resultados: A força máxima para produzir o deslocamento inicial dos implantes foi aumentando durante o período estudado, alcançando valores da ordem de 100N para ambos os tipos de implante. Foi observada integração entre o osso e a superfície dos implantes, com crescimento ósseo progressivo no interior dos

vii

poros. Não foram observadas diferenças significativas entre implantes recobertos e não recobertos por β-fosfato tricálcico.

Conclusão: Foi alcançada uma adequada osseointegração nas reconstruções cranianas utilizando implantes prototipados da liga Ti6Al4V com as características de porosidade e superfície descritas, sem influência do recobrimento cerâmico adotado. Os resultados sugerem que as características de construção utilizadas podem ser incorporadas aos implantes para reconstrução craniana para melhorar os resultados cirúrgicos.

Palavras-chave: Titânio. Osseointegração. Crânio. Próteses e Implantes. Anormalidades Craniofaciais.

viii

ABSTRACT

Background: The repair of a calvarial defect is a challenging procedure, requiring not only filling of the bone gap but long term stability of the employed material and satisfactory contour and symmetry. Several types of materials with different characteristics have been studied, as well as various methods of implant production. However, to date no ideal bone substitute has been found. The osseointegration properties of porous prototyped implants with tridimensionally interconnected pores made of the Ti6Al4V alloy and the influence of a thin layer of calcium phosphate coating were investigated.

Methods: Bilateral critical size calvarial defects were produced in thirty rats and filled with coated and uncoated implants in a randomized fashion. The animals were distributed in groups and kept for 15, 45 and 90 days before sacrifice. Implant mechanical integration to bone was evaluated with a push-out test. Bone-implant interface was analyzed using scanning electron microscopy.

Results: The maximum force to produce initial displacement of the implants increased during the study period, reaching values around 100N for both types of implants. Intimate contact between bone and implant surface was present, with progressive bone growth into the pores. No significant differences were seen between coated and uncoated implants.

Conclusion: Adequate osseointegration can be achieved in calvarial reconstructions using prototyped Ti6Al4V scaffolds with the described physical characteristics of surface and porosity. The results suggest that the proposed

ix

implant design characteristics can be incorporated into calvarial implants to improve reconstructive results.

Keywords: Titanium. Osseointegration. Skull. Prostheses and Implants. Craniofacial Abnormalities.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xii
AGRADECIMENTOS	xv
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xix
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	16
CAPÍTULO	17
CONCLUSÃO GERAL	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	53

Dedico este trabalho...

A meus pais, Sonia e Luiz Tadeu, que tudo me

ensinaram e me fizeram o que sou

A Milena, companheira de todas as horas e

fonte de estímulo sempre

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paulo Kharmandayan, pelo incentivo à entrada no programa de pósgraduação, pelo apoio e paciência na realização deste trabalho e de todos os outros, realizados ou ainda em andamento, por todos os ensinamentos diários desde a residência e neste início de carreira acadêmica.

Ao Prof. Dr. Ivan Felizardo Contrera Toro, sem o qual este trabalho não teria se concretizado, pelo incentivo durante a pós-graduação e pelo exemplo como médico, cirurgião e Professor, para mim um modelo a seguir desde a graduação.

Ao Dr. Rovilson Gilioli, pelo inestimável apoio, sempre com paciência e bom humor, durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Doutor André Luiz Jardini Munhoz, Prof. Dr. Rubens Maciel Filho e Prof^a. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, pelo auxílio na idealização, preparação e obtenção dos materiais utilizados. Ao Sr. Luis Fernando Bernardes, pelo auxílio no desenho e modelagem computacional dos implantes.

Ao Dr. Carlos Salles Lambert, pela ajuda com o revestimento cerâmico avaliação dos resultados.

A Sr. Eder Sócrates Najar Lopes pelo auxílio com os testes mecânicos de compressão.

Ao Sr. Adilson Brandão pelo empenho e paciência na realização das análises por microscopia eletrônica.

Aos Professores Dr. Marco Antônio de Camargo Bueno, Paulo Henrique Facchina Nunes, Dr. Luis Augusto Passeri, e aos Doutores Marcelo de Campos Guidi, Jussara Olivo Pinheiro Alves, Marcos Matias Motta e Rafael de Campos Ferreira Basso pelas inestimáveis contribuições à minha formação em Cirurgia Plástica.

A todos os funcionários do INCT Biofabris, do Laboratório de Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB/UNICAMP, do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração da FEQ/UNICAMP e do Laboratório Multiusuários do IFGW/UNICAMP.

xvi

Lista de llustrações

Página

Figura 1	Número de	e cirurgias	de	craniecto	mia	3
	descompressiv	va/craniotomias	s para	tratamento	de	
	neoplasias rea	lizadas no Bra	sil entre	2009 e 2013	3.	
Figura 2	Número de ci	rurgias de crar	nioplasti	a realizadas	no	3
	Brasil entre 20	09 e 2013.				
Figura 3	Modelo CAD	de construça	ão de	implante p	ara	10
	reconstrução d	raniana				
Figura 4	Ação do lase	r sobre a ca	mada o	de pó metá	lico	11
	promovendo a	sinterização d	lo mesr	no. As área	s já	
	sinterizadas p	ela ação do las	er apar	ecem ao cei	ntro	
	em coloração	pouco mais	escura	e com ma	aior	
	brilho.					
Figura 5	Representação	o esquemática	do proc	esso de DM	LS.	12
Figura 6	Processo de p	rodução de im	plante c	ustomizado	por	13
	prototipagem r	ápida				

Lista de Abreviaturas e Siglas

3D	Tridimensional
β-ΤCΡ	β-fosfato tricálcico
AI	Alumínio
ANOVA	Analysis of variance (Análise de variância)
	Bone morphogenetic protein 2 (Proteína morfogenética
DIVIF-2	óssea 2)
Ca ⁺²	Íon Cálcio
	Computer-aided Design (Desenho Assistido por
CAD	Computador)
	Computer-aided Manufacturing (Manufatura Assistida por
CAM	Computador)
	Calcium deficiente hydroxyapatite (Hidroxiapatita
ODIA	deficiente em cálcio)
Cl	Íon Cloreto
	Demineralyzed bone matrix (Matriz óssea
	desmineralizada)
	Digital Images and Communications in Medicine
DICOM	(Comunicação e Imagens Digitais em Medicina)
DMLS	Direct Metal Laser Sintering (Sinterização Direta de Metal

a Laser)

	Energy-dispersive X-ray spectroscopy (Espectroscopia
EDS	de energia de raios X dispersiva)
Fmax	Força máxima
kV	Quilovolt
Mm	Milímetro
N	Newton
Na⁺	Íon Sódio
Nm	Nanômetro
Ρ	Fósforo
PMMA	Polimetilmetacrilato
PO4 ⁻³	Fosfato
RNM	Ressonância nuclear magnética
SEM	Scanning Electron Microscopy (Microscopia eletrônica de
	varredura)
SUS	Sistema Único de Saúde
тс	Tomografia computadorizada
Ti ₆ Al ₄ V	Liga Titânio-Alumínio-Vanádio
Ti ₆ Al ₄ V+ β-TCP	Liga de Ti ₆ Al ₄ V recoberta com β -TCP
TiCP	Titânio comercialmente puro
Torr	Torricelli
W	Watt

INTRODUÇÃO GERAL

A trepanação craniana é o procedimento cirúrgico mais antigo realizado pelo homem. Relatos mostram que sua prática era comum entre povos como os incas, polinésios e egípcios. Paralelamente ao desenvolvimento técnico da trepanação craniana surgiu a necessidade de procedimentos reconstrutores. Evidências arqueológicas apontam a realização de cranioplastias utilizando materiais como conchas, cabaças, placas de prata e ouro entre os incas. Foram achados crânios próximos a peças de dimensões compatíveis com os defeitos ósseos observados ou mesmo com os materiais firmemente locados no local trepanado, o que indica que foram inseridos ainda em vida e envolvidos no processo de cicatrização. O primeiro relato de um procedimento utilizando enxerto ósseo data de 1668 por van Meekeren, quando realizou uma reconstrução craniana utilizando um xenoenxerto de calota craniana de cão^{1,2}.

A realização de cranioplastias acompanha a história do trauma cranioencefálico e a evolução no tratamento das doenças intracranianas. O número de procedimentos aumentou nos séculos XIX e XX, em grande parte devido ao elevado número de traumas causados pelas guerras². Atualmente uma parcela significativa das indicações consiste de sequelas de traumatismos ou de

pacientes previamente submetidos a craniectomias para tratamento de neoplasias ou de outras condições que cursam com hipertensão intracraniana^{2–5}. A melhora da qualidade do atendimento médico pré e intra-hospitalar tem permitido uma taxa de sobrevida cada vez maior dos indivíduos acometidos pelas condições citadas, contribuindo para o aumento do número de indicações de tratamento dos defeitos ósseos.

Além da reconstituição morfológica tridimensional da área lesada, de importância eminentemente estética, e da barreira física de proteção ao cérebro, as evidências vêm apontando para uma repercussão favorável na recuperação funcional do tecido cerebral após a realização da cranioplastia. Estudos mostram a melhora de sintomas como cefaleia e crises epilépticas, além da recuperação de déficits neurológicos cognitivos e melhora do nível de consciência em pacientes submetidos ao procedimento reparador^{2,6–8}.

Dados epidemiológicos brasileiros mostram que embora o número de craniotomias descompressivas e craniectomias para tratamento de neoplasias (duas das etiologias mais comuns de defeitos ósseos cranianos) tenha mantido certa estabilidade ao longo dos últimos cinco anos (Figura 1), houve aumento de quase 50% no número de cranioplastias (Figura 2).



Figura 1: Número de cirurgias de craniectomia descompressiva/craniotomias para tratamento de neoplasias realizadas no Brasil entre 2009 e 2013. (Fonte: DATASUS, Ministério da Saúde).



Figura 2: Número de cirurgias de cranioplastia realizadas no Brasil entre 2009 e 2013. (Fonte: DATASUS, Ministério da Saúde).

Materiais em Reconstrução Craniofacial

Os materiais utilizados em reconstrução craniofacial podem ser classificados em^{1,9–11}:

• Enxertos ósseos

- Autoenxerto: proveniente do mesmo indivíduo;

 Aloenxerto: proveniente de outro indivíduo da mesma espécie;

 Xenoenxerto: proveniente de indivíduo de outra espécie.

• Biomateriais

Inabsorvíveis: titânio, platina, polietileno, cerâmicos
 (fosfato de cálcio, hidroxiapatita), polimetilmetacrilato (PMMA),
 poliuretano, etc;

Absorvíveis: ácido polilático, ácido poliglicólico, policaprolactona, etc.

Conceitua-se biomaterial como "qualquer substância (exceto drogas) ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que possa ser utilizada por qualquer período de tempo, como todo ou parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo"⁹. Devem ser

diferenciados dos materiais biológicos, que são aqueles produzidos por um sistema biológico, como, por exemplo, pele e osso.

Foram postuladas as caraterísticas do substituto ósseo ideal, o qual deve ser forte, leve, maleável, não condutor de temperatura, esterilizável, inerte, radiolucente, não magnético, esteticamente agradável, prontamente disponível e de baixo custo¹. Todavia, ainda hoje não foi encontrado um único material capaz de reunir todas estas propriedades, o que estimula a pesquisa por alternativas.

Enxertos ósseos

Os enxertos ósseos estão entre os materiais há mais tempo empregados na reconstrução craniana. O enxerto autólogo de osso é, intuitivamente, o substituto primordial a ser utilizado. No entanto, apesar de exibir como principal atrativo a ausência de resposta imunológica contra o enxerto, o osso autólogo apresenta uma série de desvantagens. Entre estas temos sua disponibilidade limitada, dificultando a reconstrução de defeitos mais extensos, maior dificuldade de modelagem, morbidade da área doadora do enxerto e reabsorção. Em uma revisão recente, Neovius e Engstrand¹¹ mostraram que 50% dos pacientes submetidos a reconstrução com osso autólogo preservado por congelamento evoluíram com reabsorção óssea sintomática. Em outro estudo³ reportou-se que durante seguimento de longo prazo, entre os pacientes que necessitaram de mais de uma intervenção para reconstrução, o motivo mais frequente de reoperação (62%) foi a necessidade de melhoria do contorno ósseo

em decorrência de absorção. No total, de todos os pacientes que receberam enxertos ósseos, 23,5% necessitaram de revisão cirúrgica.

Titânio

O uso de metais na cranioplastia teve início na antiguidade e ganhou novo impulso nas primeiras décadas do século XX, com a utilização de metais nobres como ouro, prata e platina, e subsequentemente com a introdução de novas ligas como vitálio (cromo-cobalto-molibdênio) e ticônio (cromo-cobalto-níquel-molibdênio). Outros metais antes indisponíveis devido a incapacidade de purificação e produção em escala tiveram também sua introdução, por exemplo, o tântalo e o titânio^{1,10}.

Descoberto em 1791 pelo mineralogista inglês William Gregor, o titânio tornou-se comercialmente disponível apenas na década de 40 do século XX. A primeira utilização em reconstrução craniana foi realizada por Simpson em 1965. Na época já notavam-se características favoráveis ao seu uso como maior radiolucência em comparação a outros materiais metálicos então empregados e menor custo^{1,10}.

Atualmente o titânio encontra-se disponível sob forma de titânio comercialmente puro (TiCP) ou de ligas, sendo a mais utilizada para finalidade biomédica a liga de titânio-alumínio-vanádio (Ti₆Al₄V). A presença destes elementos auxilia na estabilização das formas cristalinas do titânio, aumentando sua força tênsil e força específica (força em relação a densidade)¹². As propriedades mecânicas do titânio aliadas a sua leveza (densidade menor que

outras ligas como aço inoxidável, vitálio e ticônio) são consideradas ótimas para uso em implantes.

Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* demonstram ausência de toxicidade celular e boa biocompatibilidade, havendo tanto o crescimento celular sobre corpos de prova semeados com culturas de células (observando-se a formação de estruturas semelhantes ao tecido ósseo) quanto a integração de implantes com o tecido ósseo em animais^{13–17}. Em âmbito clínico, trabalhos que relataram o seguimento de pacientes submetidos a cranioplastias com uso de telas e placas de titânio mostram bons resultados, tanto do ponto de vista da adequação morfológica tridimensional da área reconstruída quanto do perfil de complicações observadas^{4,18–20}.

Biocerâmicas

O tecido ósseo tem sua matriz composta por uma fase orgânica rica em colágeno e uma fase mineral inorgânica, que responde por cerca de dois terços da massa óssea. A fase inorgânica é composta predominantemente por hidroxiapatita – Ca₅(PO₄)₃(OH) – e é responsável pela resistência do osso à compressão^{21,22}. Dessa maneira é lógico o emprego da hidroxiapatita e demais compostos relacionados, como a fluoroapatita, fosfato tricálcico e fosfato tetracálcico como biomateriais na reparação óssea.

As cerâmicas de fosfato de cálcio são compostos bioativos, uma vez que interagem com o tecido ósseo formando ligações químicas com este. Após a implantação no organismo há formação de uma lâmina de moléculas de água

sobre o implante, seguida da incorporação de íons como Ca⁺², Na⁺ e Cl⁻. Proteínas são então dinamicamente adsorvidas a essa superfície, e a elas ligamse células (osteoblastos). A superfície do material implantado tem repercussão direta neste processo, com a liberação de íons Ca⁺² e PO₄⁻³ a partir do revestimento de biocerâmica exercendo influência positiva sobre a resposta celular e consequentemente melhorando o processo de regeneração óssea²².

Apesar de suas propriedades químicas favoráveis as biocerâmicas são demasiadamente frágeis para uso isolado na composição de implantes, especialmente se destinados a uso em áreas sujeitas a carga. Assim, seu maior e mais estudado emprego tem sido sob a forma de revestimento de superfície de implantes metálicos ou poliméricos. Dessa forma pode-se combinar a força mecânica do metal com as propriedades biológicas da cerâmica.

Muitos estudos têm sido publicados mostrando as propriedades de osteocondução dos revestimentos cerâmicos. A osteocondução refere-se à capacidade de um material de conduzir o crescimento ósseo em sua superfície^{22,23}. Foi demonstrado que os revestimentos cerâmicos induzem um íntimo contato ósseo com a superfície do implante^{24–26}, maior fixação do implante ao osso²⁷, facilitação de crescimento ósseo em áreas onde haja lacunas entre o osso e a superfície do implante²⁴ e o crescimento ósseo em direção ao interior dos implantes^{27,28}. Ainda, alguns estudos apontam para um possível papel destas substâncias como osteoindutoras, ou seja, capazes de induzir o crescimento ósseo e não meramente atuar como suporte^{29,30}.

Prototipagem Rápida

Prototipagem pode ser definida como a fabricação de estruturas bi ou tridimensionais utilizando gráficos computadorizados pré-programados contendo um mapa camada a camada destas estruturas³¹. Vários métodos estão disponíveis atualmente, prestando-se a diferentes materiais e aplicações, como impressão tridimensional, deposição de material fundido, estereolitografia, manufatura de objeto laminado, sinterização direta de metal a laser (DMLS), fusão seletiva a laser³².

O emprego da prototipagem rápida deu-se inicialmente na área de engenharia, dirigido à produção de estruturas complexas para uso, por exemplo, em projetos espaciais¹⁷. O primeiro passo na fabricação consiste na obtenção de uma representação tridimensional do objeto a partir de um sistema de digitalização tridimensional ou de um software de CAD (Computer Assisted Design - Desenho Assistido por Computador) (Figura 3). A seguir, o arquivo é enviado para um sistema CAM (Computer Aided Manufacturing - Manufatura Assistida por Computador), o qual secciona a estrutura em fatias paralelas entre si e perpendiculares ao eixo de construção, além de processar a trajetória da ferramenta de construção.

A DMLS é um método de construção por prototipagem no qual as partículas de pó metálico (sendo mais utilizadas na área médica as ligas de titânio como Ti₆Al₄V) são agregadas mediante um derretimento local promovido por um raio laser controlado por computador operando a temperaturas abaixo do ponto de fusão do material (sinterização). O laser percorre a superfície de trabalho coberta

pelo pó promovendo a agregação do mesmo nos pontos estabelecidos para a camada em questão (Figura 4). O processo opera segundo um princípio de construção camada a camada; quando os pontos estabelecidos para uma determinada camada foram modelados, a plataforma de construção sobre a qual deposita-se o pó é movida inferiormente e uma nova camada de pó é espalhada sobre a superfície. Inicia-se então o processo na nova camada e este repete-se até o término da construção³³ (Figura 5).



Figura 3: Modelo CAD de construção de implante para reconstrução craniana.



Figura 4: Ação do laser sobre a camada de pó metálico promovendo a sinterização do mesmo. As áreas já sinterizadas pela ação do laser aparecem ao centro em coloração pouco mais escura e com maior brilho.

Prototipagem Rápida em Cirurgia Craniofacial

No âmbito da reconstrução craniofacial a complexidade anatômica tridimensional das áreas a serem reparadas torna difícil a obtenção de um implante preciso através da modelagem manual de qualquer material a ser utilizado. A busca por melhores resultados do ponto de vista estético e funcional é um desafio constante. Este cenário levou ao uso de implantes pré-fabricados na tentativa de solucionar os problemas observados com o uso da modelagem intraoperatória.



Figura 5: Representação esquemática do processo de DMLS.

A pré-fabricação de implantes para reconstrução craniana iniciou-se com a modelagem do material no paciente, sobre o couro cabeludo da área afetada, criando uma impressão pouco precisa do defeito ósseo subjacente³⁵. A reconstrução tridimensional usando exames de imagem por tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética iniciou-se na década de 80, passando aos métodos de prototipagem rápida¹⁰. A prototipagem foi empregada na confecção de implantes inicialmente de modo indireto, no qual se produz um

modelo do crânio do paciente contendo a área de interesse ou um molde para posterior confecção manual do implante baseada nestes. O método direto, mais recentemente desenvolvido, consiste na confecção do implante por modelagem digital tomando como base uma imagem especular da área contralateral não afetada. Isto permite uma melhor acurácia tridimensional dos implantes^{10,33}. A sequência de produção de um implante customizado por prototipagem é mostrada na Figura 6.



Figura 6: Processo de produção de implante customizado por prototipagem rápida.

Aplicação Experimental de Implantes Construídos por Prototipagem

Alguns estudos recentes avaliaram o uso de implantes construídos empregando a prototipagem, quer por métodos diretos^{16,17} ou indiretos¹⁵. A construção direta tem permitido o emprego de geometrias tridimensionais mais complexas, tendendo-se à utilização de implantes porosos no intuito de promover o crescimento ósseo em seu interior e, dessa maneira, melhorar sua integração tecidual e estabilidade^{16,17,36}. O efeito positivo da porosidade sobre o crescimento ósseo já havia sido demonstrado anteriormente¹³, mas a obtenção deste tipo de estrutura de modo regular por métodos convencionais de construção sem uso de prototipagem era mais difícil.

Foi demonstrada a biocompatibilidade dos implantes de titânio construídos por métodos indiretos ou diretos (sinterização por laser), sejam estes compostos por titânio comercialmente puro (TiCP) ou pela liga Ti₆Al₄V, recobertos ou não por biocerâmicas (fosfato de cálcio)^{15–17}.

Um destes trabalhos¹⁶ utilizou estruturas porosas de liga de Ti₆Al₄V sem qualquer revestimento implantadas no crânio de porcos. Houve crescimento ósseo progressivo no interior dos implantes, mas também a formação de tecido fibroso ao redor dos mesmos, o que minimizou a área de contato ósseo. A hipótese aventada para explicar esta ocorrência foi a presença de um intervalo entre o implante e a superfície óssea, dificultando a adesão celular ao metal.

Apesar do grande volume de pesquisas e da existência de algum direcionamento com relação às características consideradas adequadas à

construção de implantes para substituição óssea, ainda não foi possível chegar a um substituto ideal. Faz-se necessária assim a realização de novos estudos com o objetivo de avaliar diferentes materiais e métodos para a construção de tais implantes, especialmente no âmbito da reconstrução craniofacial.

OBJETIVOS

1 – Avaliar a propriedade de osseointegração de implantes porosos da liga Ti₆Al₄V construídos por meio de sinterização direta de metal a laser em defeitos ósseos da calvária de ratos.

 2 – Avaliar a possível influência do recobrimento dos implantes com uma camada de β-fosfato tricálcico na integração dos mesmos.
CAPÍTULO

Calderoni DR, Gilioli R, Munhoz ALJ, Maciel Filho R, Zavaglia CAC, Lambert CS, Lopes ESN, Toro IFC, Kharmandayan P. Paired evaluation of calvarial reconstruction with prototyped titanium implants with and without ceramic coating. Acta Cirurgica Brasileira. 2014;29(9):579-587.

Paired evaluation of calvarial reconstruction with prototyped titanium implants with and without ceramic coating¹

Davi Reis Calderoni^I, Rovilson Gilioli^{II}, André Luiz Jardini Munhoz^{III}, Rubens Maciel Filho^{IV}, Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia^V, Carlos Salles Lambert^{VI}, Éder Socrates Najar Lopes^{VII}, Ivan Felizardo Contrera Toro^{VIII}, Paulo Kharmandayan^{IX}

¹Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Surgical Sciences, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP),Campinas-SP, Brazil. Intellectual and scientific content of the study, design of the protocol, surgical procedures, acquisition and interpretation of data, statistical analysis, manuscript writing.

^{II}PhD, Molecular Biology and Genetics. Head, Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animals Science, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil. Surgical procedures, acquisition of data.

^{III}PhD, Department of Products and Processes Development, School of Chemical Engineering, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil. CNPq, Technical Development and Innovation Productivity Grant Level 2. Intellectual and scientific content of the study, acquisition and interpretation of data.

^{IV}Full Professor, Department of Products and Processes Development, School of Chemical Engineering, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil. CNPq, Research Productivity Grant Level 1A. Intellectual and scientific content of the study.

^vFull Professor, Department of Materials Engineering, School of Mechanical Engineering, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil. CNPq, Research Productivity Grant Level 1A. Intellectual and scientific content of the study.

^{VI}PhD, Department of Applied Physics, Institute of Physics "Gleb Wataghin", UNICAMP, Campinas-SP, Brazil. Intellectual and scientific content of the study, acquisition and interpretation of data.

^{VII}PhD, Postgraduate Program in Mechanical Engineering, Department of Materials Engineering, School of Mechanical Engineering, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil. Acquisition and interpretation of data.

^{VIII}Associate Professor, Division of Thoracic Surgery, Department of Surgery, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil. Intellectual and scientific content of the study, critical revision.

^{IX}Associate Professor, Head, Division of Plastic Surgery, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil. Intellectual and scientific content of the study, design of the protocol, surgical procedures, interpretation of data, manuscript writing, critical revision.

ABSTRACT

PURPOSE: To investigate the osseointegration properties of prototyped implants with tridimensionally interconnected pores made of the Ti_6Al_4V alloy and the influence of a thin calcium phosphate coating.

METHODS: Bilateral critical size calvarial defects were created in thirty Wistar rats and filled with coated and uncoated implants in a randomized fashion. The animals were kept for 15, 45 and 90 days. Implant mechanical integration was evaluated with a push-out test. Bone-implant interface was analyzed using scanning electron microscopy.

RESULTS: The maximum force to produce initial displacement of the implants increased during the study period, reaching values around 100N for both types of implants. Intimate contact between bone and implant was present, with progressive bone growth into the pores. No significant differences were seen between coated and uncoated implants.

CONCLUSION: Adequate osseointegration can be achieved in calvarial reconstructions using prototyped Ti₆Al₄V Implants with the described characteristics of surface and porosity. **Key words**: Titanium. Skull. Osseointegration. Prostheses and Implants. Biocompatible Materials. Ceramics. Rats.

Introduction

Cranioplasty is one of the oldest performed surgical procedures. Archeological evidence suggests that ancient civilizations attempted to perform cranioplasties with materials such as gold, shells and gourds. Since then different materials have been employed, with variable success¹. In present times, despite the development of better implantable materials, surgeons are still challenged by the need for safer and more precise reconstructions, especially in terms of recreating as normal a cranial tridimensional contour as possible.

Titanium and its alloys have been widely used in the field of surgery for the construction of implantable devices. Their biocompatibility has been extensively demonstrated, especially related to bone, both experimentally^{2–5} and clinically^{6–9} with variable implant designs and methods of construction.

In an attempt to improve bone contact and integration with the reconstruction material, ceramics have been employed either as single constituent of implants or mainly as coating materials. The ceramic coating of metallic implants functions as a transition layer between bone tissue and the non-physiological metal surface, enhancing the contact and conducting bone growth along the surface of the implant¹⁰. Calcium phosphate coatings are reported to increase contact between bone and implant¹¹, and to enhance implant fixation, including a facilitation of bone growth over gaps between the two surfaces¹².

Rapid prototyping methods have been employed for a long time in fields where precise building of complex structures was necessary, such as aerospace engineering and racing cars development⁵. These properties were more recently found useful in medical sciences, especially regarding biomaterials research, giving rise to studies of complex geometry implant construction¹³. There is also some evidence of good osseointegration of titanium implants built by rapid prototyping in facial bone¹⁴.

The goals of this study were to evaluate the osseointegration properties of porous prototyped implants with tridimensionally interconnected pores made of the Ti_6Al_4V alloy in the setting of cranial reconstruction, and possible influences of a thin layer of calcium phosphate coating, using a model of critical size cranial defect in rats.

Methods

The study protocol was fully approved by the Committee for Ethics in Animal Research of the University of Campinas - UNICAMP, under the number 2252-1, and complied with the Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS) ethical code for animal experimentation.

Implant design and construction

Implants were designed in a round shape, with a diameter of 5 mm. Two interconnected porous layers were built, with each pore having a diameter of 500 μ m (Figure 1). Construction was performed using titanium-aluminum-vanadium (Ti₆Al₄V) alloy powder (EOS Titanium Ti64, EOS GmbH – Electro Optical Systems;

Munich, Germany), which was processed by direct metal laser sintering (DMLS) using an EOSINT M 270 (EOS GmbH) equipment.



FIGURE 1 - SEM images of prototyped Ti_6Al_4V scaffold, depicting the porosity and surface roughness obtained (Magnification: x40 left; x65 right).

Ceramic coating

Coating of the implants with β -tricalcium phosphate (β -TCP) was performed using radiofrequency assisted physical vapor deposition. The used parameters were 30W source power and a pressure of 4×10^{-2} Torr, with a duration of 25 minutes. This resulted in a coating thickness of 100 nm.

Surgical procedure

Thirty male, three month-old, Wistar rats were operated. The procedure was performed under general anesthesia with intraperitonially administered xylazine (Xilazin[®], Syntec do Brasil Ltda., Cotia, Brazil) and ketamine (Cetamin[®], Syntec do Brasil Ltda., Cotia, Brazil) and ketamine (cetamin[®], Syntec do Brasil Ltda., Cotia, Brazil). The animals were immobilized using a stereotaxic surgery frame. A median incision was made in the scalp and periosteum, which

was laterally dissected from the calvarium using an elevator. Two parallel, fullthickness craniotomies with 5mm diameter were then performed on the parietal bones using a low-speed drill under saline irrigation, according to the critical size defect proposed by Bosch¹⁵. Each animal received one Ti₆Al₄V and one Ti₆Al₄V+ β -TCP implant. The position of the implants was randomized between left and right sides using a list of randomized positions for the Ti₆Al₄V+ β -TCP implant provided by an online random number generator (available at www.randomization.com). Then, periosteum and scalp were separately sutured using 5-0 nylon sutures. Each animal was numbered and separated into three groups that would be kept for different periods before euthanasia, i.e. 15, 45 and 90 days.

Animal sacrifice and material retrieval

The animals were euthanized in groups after the assigned postoperative periods, using a carbon dioxide inhalation chamber.

The scalp over the operated region was removed and after careful macroscopic observation and periosteal dissection, the uppermost part of the cranium was cut off at the levels of temporal, occipital and frontal bones, including both implants fully surrounded by uninjured bone. Specimens were initially kept in saline solution and refrigerated to preserve fresh tissue characteristics.

Push-out tests

Push-out tests were performed using a mechanical essay equipment, model DL 2000 (EMIC Equipamentos e Sistemas de Ensaio LTDA, São José dos Pinhais,

Brazil), with a 500 N probe model CCE500N (EMIC). Acquired data were processed with TESC version 3.04 software (EMIC).

The tests were performed in an up to 24-hour period following obtainment of the samples. The cranial bone containing the implants was carefully positioned over a centrally perforated stand, with the convex outer face down. The stand hole had a larger diameter than the one of the implant in order not to restrain its downward movement during the test. Each implant was tested separately after proper positioning over the stand. The test was conducted in a nondestructive fashion. The execution of each essay was followed in real time through a force x time graph exhibited by the software. Once the maximum force (Fmax) was reached and its values constantly decreased, the test was interrupted.

Samples preparation and cutting

After the push-out tests, samples were fixed in formaldehyde solution and embedded in resin. Cutting of the samples was performed using a Model 650 Low Speed Diamond Wheel Saw (South Bay Technologies, Inc., San Clemente, USA) and a four inch diamond waffering blade (Buehler, Lake Bluff, USA). The blocks were cut with a coronal plane orientation, initially tangential to the anterior edges of both implants. Two sequential 1mm-thick cuts were made starting from the anterior edge in a posterior direction, in order to analyze the interior of the implants.

Scanning electron microscopy analyses

Microscopic analyses were always performed on the occipital face of the cuts. Samples were coated with gold using a Sputter Coater Model SC7620

(Quorum Technologies Ltd., Ashford, United Kingdom). Scanning electron microscopy (SEM) images and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) were obtained with a Leo 440i microscope coupled with a EDS detector model 6070 (LEO Electron Microscopy, Cambridge, United Kingdom).

EDS dot mapping images were obtained using the following parameters: magnification of 50x, beam acceleration of 20 kV and acquisition time of three minutes. The chosen elements for image construction were Titanium (red dots) and Calcium (green dots).

All SEM and EDS images analyzed correspond to the occipital (posterior) surface of the second 1mm cut, i.e. 2mm from the frontal (anterior) edge of the implants.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Bioestat 5.0 software (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Tefé, Brazil). The continuous variable "Force" obtained from push-out tests was analyzed for normal distribution within groups using the Shapiro-Wilk test. Intragroup comparisons between the different types of implants were done by using two-tailed Student's t-test for paired samples. Comparisons between different time groups were performed by using single-factor Analysis of Variance (ANOVA) test.

Results

All animals had an uneventful postoperative course and exhibited normal behavior and no discernible deficits, except for one pertaining to the third operated group (15 days), which died minutes after the surgical procedure, probably due to anesthetic prolonged effect.

Macroscopic evaluation

Wound healing was considered satisfactory and no noticeable scalp scars were seen at the time of necropsies. After scalp removal, complete periosteal healing was observed in all animals, with no gross signs of inflammation. Also, during periosteal elevation from the calvarium, a firm adhesion of the former to the upper surface of the implant was invariably present (Figure 2 – Left).

Once the bone specimens were retrieved, it was observed that the implants were surrounded by bone of normal appearance, with no signs of interposed fibrous tissue. On the inner surface of the specimens, bone ingrowth towards the implant pores could be seen, especially in those pertaining to the animals of 45-day and 90-day groups (Figure 2 - Right). By applying gentle pressure over the implants no visible movement ensued.



FIGURE 2 - Dissection performed after animal sacrifice showing firm periosteal adhesion to the surface of the implant (**left**). Inner surface of the specimen recovered exhibiting growth of bone into the pores of the implant (**right**).

Push-out tests

The mean Fmax required to disrupt the implant-bone interface was progressively higher from the 15-day to the 90-day groups and this tendency was observed for both types of implants. Comparison of the values among the groups revealed that forces needed to displace either type of implant after 45 and 90 days were significantly higher than those needed at 15 days. Differences between values for each type of implant at 45 and 90 days groups did not reach statistical significance. No significant differences were observed between the mean maximum forces within groups between Ti₆Al₄V and Ti₆Al₄V+ β -TCP implants (Table 1).

TABLE 1 - Mean results of push-out tests for type of implant and groups (Fmaxvalues in Newtons).

	15 days	45 days	90 days
Ti ₆ Al ₄ V	21.3	98.7*	97.3*
Ti ₆ Al₄V+β-TCP	12.4	83.6#	93.4 [#]

*p<0.05 compared to mean value for $Ti_{6}AI_{4}V$ at 15 days.

[#]p<0.05 compared to mean value for Ti₆Al₄V+β-TCP at 15 days.

SEM and EDS analyses

Standard SEM images better evaluated growth of bone into the pores, especially the more centrally located ones as seen on the coronal cuts of the implants. A progressive filling of the pores by bone was observed between the groups, with the 90-day one exhibiting the highest occupation. This tendency was equally present in both types of implants (Figures 3 and 4). Also, intimate contact between newly formed bone and the inner surface of the channels could be observed and confirmed by EDS spectra (Figure 5).



FIGURE 3 - SEM images of Ti_6Al_4V implants at 15-day (**upper**), 45-day (**center**) and 90-day (**lower**) stages, showing progressive increase in pores occupation by bone ingrowth (Magnification x50).



FIGURE 4 - SEM images of $Ti_6Al_4V+\beta$ -TCP implants at 15-day (**upper**), 45-day (**center**) and 90-day (**lower**) stages, showing progressive increase in pores occupation by bone ingrowth (Magnification x50).



FIGURE 5 - Close-up of the internal wall of a pore of a Ti_6Al_4V implant belonging to the 90-day group. EDS spectra demonstrating the presence of bone (Region L2 – **right** spectrum) in intimate contact with the scaffold surface (Region L1 – **left** spectrum) (Magnification x350).

Dot map images obtained using EDS technique were useful to assess the morphology of the cranial bone surrounding the implants as well as the bone/implant interface. By comparing images obtained from the three groups, some enlargement of the native bone's edge in contact with the implant as well as progressive bone penetration into the peripheral pores was noticed. Animals from the 15-day group exhibited thinner bone edges surrounding the implant and poorer contact was seen between them. Both 45 and 90-day groups' cuts showed similar appearances, in which native bone edges had greater contact with the lateral implant surface. Also, bone growth was seen towards both levels of pores and on the lower surface (which was in contact with the dura mater) of some implants (Figures 6 and 7).



FIGURE 6 - EDS dot map images of Ti_6Al_4V implants at 15-day (**upper**), 45-day (**center**) and 90-day (**lower**) stages, showing progressive enhancement of bone contact with the lateral surface of the implants and growth of bone into the pores (Red dots: Titanium; Green dots: Calcium. Magnification x50).



FIGURE 7 - EDS dot map images of Ti₆Al₄V+ β -TCP implants at 15day (**upper**), 45-day (**center**) and 90-day (**lower**) stages, showing progressive enhancement of bone contact with the lateral surface of the implants and growth of bone into the pores (Red dots: Titanium; Green dots: Calcium. Magnification x50).

Discussion

Titanium and its alloys are extensively used to produce implants for bone reconstruction and fixation due to their biocompatibility^{10,16}. Recently, the incorporation of rapid prototyping methods allowed the construction of more precise and customized implants, a great advantage in the setting of craniofacial reconstruction¹⁷. The aim of this study was to evaluate the osseointegration capability of customized Ti₆Al₄V implants produced by DMLS, with and without a thin β -TCP coating, in a rat cranial reconstruction model.

The experimental animal model employed in this study of bilateral parietal 5mm craniotomies has been frequently used due to its favorable characteristics, the main one being the ability to produce paired analysis. It also fulfills the criteria for a critical size defect, and allows for the evaluation of biomaterials for bone reconstruction^{15,18,19}.

In macroscopic observations an invariably firm periosteal adhesion was seen over all outer implant surfaces. Moreover, surrounding bone was closely in contact with the implants, without any discernible mobility or interposed fibrous tissue. Also, the fact that the implants were slightly thicker than the calvarial bone allowed a clear visualization of bone ingrowth towards the lateral pores (Figure 2). These observations were confirmed by SEM images, which showed progressive centripetal bone filling of both levels of pores, with close contact between bone and implant surface.

The described findings agree with the described characteristics of biocompatibility exhibited by titanium and its alloys with bone tissue. Several

studies have demonstrated these properties either with osteoblast cultures^{5,20} or with in vivo experiments^{3,4,11}.

Integration between bone and implants was further demonstrated by pushout test results. It is accepted that such tests are able to estimate the mechanical interlocking between bone and implant²¹. The results of push-out tests demonstrated that a considerably high force was required to disrupt the boneimplant interface, and that it was increasingly higher as the period elapsed between surgery and sacrifice grew, reaching values around 100N. These data indirectly demonstrate the progressive ingrowth of bone towards the implant that took place mainly during the period between 15 and 45 days, which was also demonstrated by the SEM and EDS images.

There are few studies in the literature that used push-out tests to evaluate the strength of the bone-implant interface in the calvaria, although this method is widely employed in other experimental bone surgery models, such as those of long bones of the limbs^{22,23}. In an evaluation of the influence of growth hormone supplementation on calvarial healing using an identical experimental model, a Fmax of 14.1 \pm 5.1N was exerted on the defect of the placebo group and 35.4 \pm 10.3N in the treatment group until a fracture ensued²⁴. Some papers evaluating a variety of biomaterials for calvarial reconstruction in rats by means of push-out tests executed similarly to what was done in our study had variable results. In the study of Jones *et al.*¹⁸ Fmax values around 50N and 30N were obtained after 3 months of reconstruction with demineralized bone matrix (DBM) and bone grafts respectively. Two studies assessing reconstruction with scaffolds treated with growth factors obtained a Fmax of 130N for implants made of polycaprolactone

and collagen treated with bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) after 15 weeks²⁵, and of 138N using calcium deficient hydroxyapatite (CDHA) implants coated with chitosan and treated with BMP-2 after eight weeks²⁶.

No studies were found applying push-out tests to evaluate calvarial reconstructions with titanium implants and, to the best of our knowledge, this is the first one to do so. The obtained Fmax values demonstrate that there was progressive strengthening of the interface between bone and both types of scaffold during the studied period. Comparing these with the previous literature findings, it can be noticed that they were superior to what has been found with traditionally employed materials such as autologous bone grafts, which is considered by many as the standard material for calvarial reconstruction, as well as with DBM and purely ceramic implants (in the paper by Zhao *et al.*²⁶, scaffolds made solely with CDHA obtained a Fmax of 72N after eight weeks). Besides that, the Fmax values obtained with the titanium scaffolds in our study were close to the ones required for fracturing intact calvarial bones of 12-week-old rats, which were found to range from 80N to 100N²⁵.

The variation of Fmax values among the experimental groups shows that most of bone ingrowth occurred until 45 days after the surgical procedure, with no significant improvement after this period (no statistically significant difference between 45-day and 90-day groups). This evolution pattern was also observed in other experimental in vivo studies^{18,27} and pointed out in a recent review on critical size calvarial defects in rats¹⁹.

It is generally reported in the literature that ceramic coatings improve the osseointegration of metallic scaffolds by promoting the filling of gaps between bone

and implant¹², enhancing bone contact with the implant surface^{11,28} and possessing osteoinductive properties^{29,30}. However, the results of experimental studies comparing titanium implants with and without ceramic coatings have conflicting results, with evidence either of lack of benefit^{31–35} or superior results^{11,12,28,36} with bone growth acceleration³⁷. Taking together the results of push-out tests and SEM images observations, it was not possible to demonstrate a benefit of the β -TCP coating. It is possible that the employed coating characteristics were not adequate to promote or enhance bone ingrowth to an extent that was significantly different from what was observed with the uncoated scaffolds.

The concept that drove the design of the scaffolds used in this study was to obtain osseointegrated customized titanium implants built by rapid prototyping. This would allow for better results in terms of contour and symmetry, which are of vital importance in craniofacial reconstruction and a drawback of traditional methods. Besides, complications such as postoperative implant displacement, infections and implant exposure could be potentially reduced⁶. One other advantage would be the reduction of operative time, since time consuming intraoperative modeling would not be necessary¹⁷.

Recent reviews emphasized the pivotal role of implant surface physical components (mainly porosity and roughness) to promote adequate ossointegration^{38–40}. Additionally, there is a chemical component that can be added, mainly ceramic coatings, in an attempt to establish a more receptive surface for cell adhesion by mimicking bone tissue and enabling ionic exchanges with host tissue¹⁰.

It has been demonstrated that the scaffold design and building method used in our study were able to provide an optimal environment for bon ingrowth, since the key physical elements that favor osseointegration were present, i.e. tridimensionally interconnected pores with adequate diameter and a sufficiently irregular surface to promote cell adhesion and osteoconduction. The lack of benefit of the ceramic coating in our study could be attributed either to non-ideal settings of the produced coating, such as its thickness, or to an already satisfactory enough result of the uncoated implant that could hinder the detection of an eventual influence. It is possible then that in the setting of calvarial reconstruction the addition of a ceramic coating would not be essential, once an adequately designed implant is provided.

Conclusion

Adequate osseointegration can be achieved in calvarial reconstructions using prototyped Ti_6AI_4V scaffolds with the described physical characteristics of surface and porosity.

References

- Sanan A, Haines SJ. Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. Neurosurgery. 1997 Mar;40(3):588–603. PMID: 9055300
- 2. Bandyopadhyay A, Espana F, Balla VK, Bose S, Ohgami Y, Davies NM. Influence of porosity on mechanical properties and in vivo response of

Ti6Al4V implants. Acta Biomater. 2010 May;6(4):1640–8. doi: 10.1016/j.actbio.2009.11.011

- Vehof JWM, Haus MTU, de Ruijter AE, Spauwen PHM, Jansen J a. Bone formation in transforming growth factor beta-I-loaded titanium fiber mesh implants. Clin Oral Implants Res. 2002 Mar;13(1):94–102. doi: 10.1034/j.1600-0501.2002.130112.x
- Ponader S, von Wilmowsky C, Widenmayer M, Lutz R, Heinl P, Körner C, Singer RF, Nkenke E, Neukam FW, Schlegel KA. In vivo performance of selective electron beam-melted Ti-6Al-4V structures. J Biomed Mater Res A. 2010 Jan;92(1):56–62. doi: 10.1002/jbm.a.32337
- Warnke PH, Douglas T, Wollny P, Sherry E, Steiner M, Galonska S, Becker ST, Springer IN, Wiltfang J, Sivananthan S. Rapid prototyping: porous titanium alloy scaffolds produced by selective laser melting for bone tissue engineering. Tissue Eng Part C Methods. 2009 Jul;15(2):115–24. doi: 10.1089/ten.tec.2008.0288
- Neovius E, Engstrand T. Craniofacial reconstruction with bone and biomaterials: review over the last 11 years. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010 Oct;63(10):1615–23. doi: 10.1016/j.bjps.2009.06.003
- Cabraja M, Klein M, Lehmann T-N. Long-term results following titanium cranioplasty of large skull defects. Neurosurg Focus. 2009 Jul;26(6):E10. doi: 10.3171/2009.3.FOCUS091

- Kuttenberger JJ, Hardt N. Long-term results following reconstruction of craniofacial defects with titanium micro-mesh systems. J Craniomaxillofac Surg. 2001 Apr;29(2):75–81. doi:10.1054/jcms.2001.0197
- Joffe J, Harris M, Kahugu F, Nicoll S. A prospective study of computer-aided design and manufacture of titanium plate for cranioplasty and its clinical outcome. Br J Neurosurg. 1999 Dec;13(6):576-80. PMID: 10715726
- De Jonge LT, Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Jansen JA. Organicinorganic surface modifications for titanium implant surfaces. Pharm Res. 2008 Oct;25(10):2357–69. doi: 10.1007/s11095-008-9617-0
- Dhert WJ, Klein CP, Jansen JA, van der Velde EA, Vriesde RC, Rozing PM, de Groot K. A histological and histomorphometrical investigation of fluorapatite, magnesiumwhitlockite, and hydroxylapatite plasma-sprayed coatings in goats. J Biomed Mater Res. 1993 Jan;27(1):127–38. doi: 10.1002/jbm.820270116
- Søballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Hjortdal VE, Juhl GI, Pedersen CM, Hvid I, Bünger C. Gap healing enhanced by hydroxyapatite coating in dogs. Clin Orthop Relat Res. 1991 Nov;(272):300–7. PMID: 1657476
- Goiato MC, Santos MR, Pesqueira AA, Moreno A, dos Santos DM, Haddad MF. Prototyping for surgical and prosthetic treatment. J Craniofac Surg. 2011 May;22(3):914–7. doi: 10.1097/SCS.0b013e31820f7f90

- Mangano C, Piattelli A, Raspanti M, Mangano F, Cassoni A, Iezzi G, Shibli JA. Scanning electron microscopy (SEM) and X-ray dispersive spectrometry evaluation of direct laser metal sintering surface and human bone interface: a case series. Lasers Med Sci. 2011 Jan;26(1):133–8. doi: 10.1007/s10103-010-0831-8
- 15. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. J Craniofac Surg. 1998 Jul;9(4):310–
 6. PMID: 9780924
- Akagawa Y, Abe Y. Titanium: the ultimate solution or an evolutionary step?
 Int J Prosthodont. 2003 Jan;16 Suppl:28–9. PMID: 14661700
- Chim H, Schantz J-T. New frontiers in calvarial reconstruction: integrating computer-assisted design and tissue engineering in cranioplasty. Plast Reconstr Surg. 2005 Nov;116(6):1726–41. doi: 10.1097/01.prs.0000182386.78775.cd
- Jones L, Thomsen JS, Mosekilde L, Bosch C, Melsen B. Biomechanical evaluation of rat skull defects, 1, 3, and 6 months after implantation with osteopromotive substances. J Craniomaxillofac Surg. 2007 Dec;35(8):350–7. doi: 10.1016/j.jcms.2007.06.004
- Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. Clin Oral Implants Res. 2014 Aug;25(8):879-93. doi: 10.1111/clr.12194

- Frosch K-H, Barvencik F, Lohmann CH, Viereck V, Siggelkow H, Breme J, Dresing K, Stürmer KM. Migration, matrix production and lamellar bone formation of human osteoblast-like cells in porous titanium implants. Cells Tissues Organs. 2002 Jan;170(4):214–27. doi: 10.1159/000047925
- Dhert WJ, Verheyen CC, Braak LH, de Wijn JR, Klein CP, de Groot K, Rozing PM. A finite element analysis of the push-out test: influence of test conditions. J Biomed Mater Res. 1992 Jan;26(1):119–30. doi: 10.1002/jbm.820260111
- Babiker H, Ding M, Sandri M, Tampieri A, Overgaard S. The effects of bone marrow aspirate, bone graft, and collagen composites on fixation of titanium implants. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2012 May;100(3):759–66. doi: 10.1002/jbm.b.32509
- Chung C-J, Su R-T, cabandyoChu H-J, Chen H-T, Tsou H-K, He J-L. Plasma electrolytic oxidation of titanium and improvement in osseointegration. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2013 Aug;101(6):1023–30. doi: 10.1002/jbm.b.32912
- 24. Cacciafesta V, Dalstra M, Bosch C, Melsen B, Andreassen TT. Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects. Eur J Orthod. 2001 Dec;23(6):733–40. doi: 10.1093/ejo/23.6.733
- Sawyer AA, Song SJ, Susanto E, Chuan P, Lam CXF, Woodruff MA, Hutmacher DW, Cool SM. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. Biomaterials. 2009 May;30(13):2479–88. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.055

- Zhao J, Shen G, Liu C, Wang S, Zhang W, Zhang X, Zhang X, Ye D, Wei J, Zhang Z, Jiang X. Enhanced healing of rat calvarial defects with sulfated chitosan-coated calcium-deficient hydroxyapatite/bone morphogenetic protein 2 scaffolds. Tissue Eng Part A. 2012 Jan;18(1-2):185–97. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0297
- Yeo A, Wong WJ, Teoh S-H. Surface modification of PCL-TCP scaffolds in rabbit calvaria defects: evaluation of scaffold degradation profile, biomechanical properties and bone healing patterns. J Biomed Mater Res A. 2010 Jul;93(4):1358–67. doi: 10.1002/jbm.a.32633
- Goyenvalle E, Aguado E, Nguyen J-M, Passuti N, Le Guehennec L, Layrolle P, Daculsi G. Osteointegration of femoral stem prostheses with a bilayered calcium phosphate coating. Biomaterials. 2006 Mar;27(7):1119–28. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.039
- Li J, Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Wilson CE, de Wijn JR, van Blitterswijk C a, de Groot K. Biological performance in goats of a porous titanium alloy-biphasic calcium phosphate composite. Biomaterials. 2007 Oct;28(29):4209–18. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.05.042
- Ohgushi H, Okumura M, Tamai S, Shors EC, Caplan AI. Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation. J Biomed Mater Res. 1990 Dec;24(12):1563–70. doi: 10.1002/jbm.820241202
- 31. Klein CP, Patka P, Wolke JG, de Blieck-Hogervorst JM, de Groot K. Longterm in vivo study of plasma-sprayed coatings on titanium alloys of

tetracalcium phosphate, hydroxyapatite and alpha-tricalcium phosphate. Biomaterials. 1994 Jan;15(2):146–50. doi: 10.1016/0142-9612(94)90264-X

- 32. Wheeler DL, Campbell AA, Graff GL, Miller GJ. Technical Note Histological and biomechanical evaluation of calcium phosphate coatings applied through surface-induced mineralization to porous titanium implants. J Biomed Mater Res. 1997 Mar;34(4):539–43. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636
- Lopez-Heredia M a, Sohier J, Gaillard C, Quillard S, Dorget M, Layrolle P. Rapid prototyped porous titanium coated with calcium phosphate as a scaffold for bone tissue engineering. Biomaterials. 2008 Jul;29(17):2608–15. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.02.021
- Wang C, Karlis GA, Anderson GI, Dunstan CR, Carbone A, Berger G, Ploska U, Zreiqat H. Bone growth is enhanced by novel bioceramic coatings on Ti alloy implants. J Biomed Mater Res A. 2009 Aug;90(2):419–28. doi: 10.1002/jbm.a.32111
- 35. Borsari V, Fini M, Giavaresi G, Rimondini L, Consolo U, Chiusoli L, Salito A, Volpert A, Chiesa R, Giardino R. Osteointegration of titanium and hydroxyapatite rough surfaces in healthy and compromised cortical and trabecular bone: in vivo comparative study on young , aged , and estrogendeficient sheep. J Orthoped Res. 2007 Sep;25(9):1250–60. doi: 10.1002/jor.20413
- 36. Walschot LHB, Aquarius R, Schreurs BW, Verdonschot N, Buma P. Osteoconduction of impacted porous titanium particles with a calciumphosphate coating is comparable to osteoconduction of impacted allograft

bone particles: in vivo study in a nonloaded goat model. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2012 Aug;100(6):1483–9. doi: 10.1002/jbm.b.32716

- Hirota M, Hayakawa T, Yoshinari M, Ametani A, Shima T, Monden Y, Ozawa T, Sato M, Koyama C, Tamai N, Iwai T, Tohnai I. Hydroxyapatite coating for titanium fibre mesh scaffold enhances osteoblast activity and bone tissue formation. Int J Oral Maxillofac Surg. 2012 Oct;41(10):1304–9. doi: 10.1016/j.ijom.2011.12.035
- Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. Biomaterials. 2005 Sep;26(27):5474–91. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002
- Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. Clin Oral Implants Res. 2009 Sep;20(Suppl 4):172–84. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x
- Surmenev RA, Surmeneva MA, Ivanova AA. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis A review. Acta Biomater. 2014 Mar;10(2):557–79. doi: 10.1016/j.actbio.2013.10.036

Correspondence:

Prof. Dr. Paulo Kharmandayan Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 Cidade Universitária "Zeferino Vaz" Caixa Postal: 6111 13083-887 Campinas - SP Brasil Tels.: (55 11)95020-2080 / (55 19)3521-7092 Fax: (55 19)3521-8043 pkharmand@hotmail.com

Received: Apr 24, 2014 Review: Jun 25, 2014 Accepted: July 23, 2014 Conflict of interest: none Financial source: Biofabris National Institute of Science and Technology, Brazilian Ministry of Science and Technology (MCT)

¹Research performed at Laboratory of Animal Quality Control, Multidisciplinary Center for Biological Investigation, Laboratory Animals Science and Division of Plastic Surgery, Department of Surgery, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Brazil. Part of PhD degree thesis, Postgraduate Program in Surgical Sciences. Tutor: Paulo Kharmandayan.

CONCLUSÃO GERAL

1- Os implantes de liga de Ti₆Al₄V porosos construídos por meio de prototipagem DMLS com a configuração proposta apresentaram boa integração ao tecido ósseo da calvária, demonstrada pelo crescimento ósseo progressivo no interior dos poros e aumento da resistência mecânica da interface.

2- Não houve influência do revestimento cerâmico utilizado na integração dos implantes ao osso.

REFERÊNCIAS

1. Sanan A, Haines SJ. Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. Neurosurgery. 1997 Mar;40(3):588–603.

2. Dujovny M, Aviles A, Agner C, Fernandez P, Charbel FT. Cranioplasty: cosmetic or therapeutic?. Surg Neurol. 1997 Mar;47(3):238-41.

3. Moreira-Gonzalez A, Jackson IT, Miyawaki T, Barakat K, DiNick V. Clinical outcome in cranioplasty: critical review in long-term follow-up. J Craniofac Surg. 2003 Mar;14(2):144–53.

4. Matsuno A, Tanaka H, Iwamuro H, Takanashi S, Miyawaki S, Nakashima M, Nakaguchi H, Nagashima T. Analyses of the factors influencing bone graft infection after delayed cranioplasty. Acta Neurochir (Wien). 2006 May;148(5):535–40.

5. Gooch MR, Gin GE, Kenning TJ, German JW. Complications of cranioplasty following decompressive craniectomy: analysis of 62 cases. Neurosurg Focus. 2009 Jun;26(6):E9.

6. Agner C, Dujovny M, Gaviria M. Neurocognitive assessment before and after cranioplasty. Acta Neurochir (Wien). 2002 Oct;144(10):1033–40.

7. Sakamoto S, Eguchi K, Kiura Y, Arita K, Kurisu K. CT perfusion imaging in the syndrome of the sinking skin flap before and after cranioplasty. Clin Neurol Neurosurg. 2006 Sep;108(6):583–5.

8. Liang W, Xiaofeng Y, Weiguo L, Gang S, Xuesheng Z, Fei C, Gu L. Cranioplasty of large cranial defect at an early stage after decompressive craniectomy performed for severe head trauma. J Craniofac Surg. 2007 May;18(3):526–32.

9. Park JB. Biomaterials. In: Bronzino JD (Ed.) The Biomedical Engineering Handbook: Second Edition. Boca Raton: CRC Press LLC; 2000.

10. Chim H, Schantz J-T. New Frontiers in Calvarial Reconstruction: Integrating Computer-Assisted Design and Tissue Engineering in Cranioplasty. Plast Reconstr Surg. 2005 Nov;116(6):1726–41.

11. Neovius E, Engstrand T. Craniofacial reconstruction with bone and biomaterials: review over the last 11 years. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010 Oct;63(10):1615–23.

12. Park, J B, Kim, YK. Metallic Biomaterials. In: Bronzino JD (ed.) The Biomedical Engineering Handbook: Second Edition. Boca Raton: CRC Press LLC; 2000.

13. Frosch KH, Barvencik F, Lohmann CH, Viereck V, Siggelkow H, Breme J, Dresing K, Stürmer KM. Migration, matrix production and lamellar bone formation of human osteoblast-like cells in porous titanium implants. Cells Tissues Organs. 2002;170(4):214–27.

14. Goyenvalle E, Aguado E, Nguyen JM, Passuti N, Le Guehennec L, Layrolle P, Daculsi G. Osteointegration of femoral stem prostheses with a bilayered calcium phosphate coating. Biomaterials. 2006 Mar;27(7):1119–28.

15. Lopez-Heredia MA, Sohier J, Gaillard C, Quillard S, Dorget M, Layrolle P. Rapid prototyped porous titanium coated with calcium phosphate as a scaffold for bone tissue engineering. Biomaterials. 2008 Jun;29(17):2608–15.

16. Ponader S, von Wilmowsky C, Widenmayer M, Lutz R, Heinl P, Körner C, Singer RF, Nkenke E, Neukam FW, Schlegel KA. In vivo performance of selective electron beam-melted Ti_6AI_4V structures. J Biomed Mater Res A. 2010 Jan;92(1):56–62.

17. Warnke PH, Douglas T, Wollny P, Sherry E, Steiner M, Galonska S, Becker ST, Springer IN, Wiltfang J, Sivananthan S. Rapid prototyping: porous titanium alloy scaffolds produced by selective laser melting for bone tissue engineering. Tissue Eng Part C Methods. 2009 Jun;15(2):115–24.

18. Joffe J, Harris M, Kahugu F, Nicoll S, Linney A, Richards R. A prospective study of computer-aided design and manufacture of titanium plate for cranioplasty and its clinical outcome. Br J Neurosurg. 1999 Dec;13(6):576-80.

19. Kuttenberger JJ, Hardt N. Long-term results following reconstruction of craniofacial defects with titanium micro-mesh systems. J Craniomaxillofac Surg. 2001 Apr;29(2):75–81.

20. Cabraja M, Klein M, Lehmann TN. Long-term results following titanium cranioplasty of large skull defects. Neurosurg Focus. 2009 Jun;26(6):E10.

21. Chen Q, Bretcanu O, Boccaccini A. Inorganic and Composite Bioactive Scaffolds for Bone Tissue Engineering. In: Chu P, Liu X (eds.). Biomaterials Fabrication and Processing Handbook. Boca Raton: CRC Press; 2008.

22. De Jonge LT, Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Jansen JA. Organic-inorganic surface modifications for titanium implant surfaces. Pharm Res. 2008 Oct;25(10):2357–69.

23. Geesink RG. Osteoconductive coatings for total joint arthroplasty. Clin Orthop Relat Res. 2002 Feb;(395):53–65.

24. Søballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Hjortdal VE, Juhl GI, Pedersen CM, Hvid I, Bünger C. Gap healing enhanced by hydroxyapatite coating in dogs. Clin Orthop Relat Res. 1991 Nov;(272):300–7.

25. Dhert WJ, Klein CP, Jansen JA, van der Velde EA, Vriesde RC, Rozing PM, de Groot K. A histological and histomorphometrical investigation of fluorapatite, magnesiumwhitlockite, and hydroxylapatite plasma-sprayed coatings in goats. J Biomed Mater Res. 1993 Jan;27(1):127–38.

26. Xu S, Lin K, Wang Z, Chang J, Wang L, Lu J, Ning C. Reconstruction of calvarial defect of rabbits using porous calcium silicate bioactive ceramics. Biomaterials. 2008 Jun;29(17):2588–96.

27. Søballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Bünger C. Hydroxyapatite coating converts fibrous tissue to bone around loaded implants. J Bone Joint Surg Br. 1993 Mar;75(2):270–8.

28. Ohgushi H, Okumura M, Tamai S, Shors EC, Caplan AI. Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation. J Biomed Mater Res. 1990 Dec;24(12):1563–70.

29. Li J, Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Wilson CE, de Wijn JR, van Blitterswijk CA, de Groot K. Biological performance in goats of a porous titanium alloy-biphasic calcium phosphate composite. Biomaterials. 2007 Oct;28(29):4209–18.

30. Surmenev RA, Surmeneva MA, Ivanova AA. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis - A review. Acta Biomater. 2014 Feb;10(2):557–79.

31. Vozzi G, Ahluwalia A. Rapid Prototyping Methods for Tissue Engineering Applications. In: Liu X, Chu P (Eds). Biomaterials Fabrication and Processing Handbook. Boca Raton: CRC Press LLC; 2008.

32. Kumar S, Kruth J-P. Composites by rapid prototyping technology. Mater Des. 2010 Feb;31(2):850–6.

33. Bertol LS, Júnior WK, Silva FP, Aumund-Kopp C. Medical design: Direct metal laser sintering of Ti₆Al₄V. Mater Des. 2010 Sep;31(8):3982–8.

34. Jardini AL, Larosa MA, Zavaglia CADC, Bernardes LF, Lambert CS, Kharmandayan P, Calderoni DR, Maciel Filho R. Customised titanium implant fabricated in additive manufacturing for craniomaxillofacial surgery. Virtual Phys Prototyp. 2014 Apr;9(2):1–11.

35. Gopakumar S. RP in medicine: a case study in cranial reconstructive surgery. Rapid Prototyp J. 2004;10(3):207–11.

36. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. Biomaterials. 2005 Sep;26(27):5474–91.
ANEXOS

ANEXO 1: Aprovação do protocolo de estudo pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Unicamp



Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº <u>2252-1</u>, sobre "<u>Avaliação do uso de placas</u> <u>sinterizadas de titânio em falhas ósseas na calvária de ratos</u>", sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Paulo Kharmandayan / Davi Reis Calderoni</u>, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em <u>30 de setembro de</u> <u>2010</u>.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº <u>2252-1</u>, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on <u>September 30, 2010</u>.

Campinas, 30 de setembro de 2010.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente

Fátima Alonso Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/ ANEXO 2: Carta de autorização do editor da revista para inclusão do artigo

Imprimir

https://br-mg4.mail.yahoo.com/neo/launch?.rand=c6sqv4dh2mtq2

Assunto:	RES: Autorização copyright
De:	Saul Goldenberg (sgolden@terra.com.br)
Para:	davicalderoni@yahoo.com.br;
Data:	Sexta-feira, 16 de Janeiro de 2015 12:30

CARTA DE AUTORIZAÇÃO

Artigo intitulado

Paired evaluation of calvarial reconstruction with prototyped titanium implants with and without ceramic coating

dos autores

Calderoni DR, Gilioli R, Munhoz AL, Maciel Filho R, Zavaglia CA, Lambert CS, Lopes ES, Toro IF, Kharmandayan P.

Publicado na Acta Cir Bras. 2014 Sep;29(9):579-87.

Está autorizado para inserção de cópia do artigo publicado.

Prof. Saul Goldenberg

Editor Chefe

Acta Cir Bras

16/01/2015 22:46