

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

ENNYO SOBRAL CRISPIM DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA SUPERFÍCIE TRATADA DE IMPLANTES
DENTAIS POR MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS
OSTEOBLÁSTICAS**

SÃO PAULO

2008

ENNYO SOBRAL CRISPIM DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA SUPERFÍCIE TRATADA DE IMPLANTES
DENTAIS POR MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS
OSTEOBLÁSTICAS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Odontologia com área de concentração em Implantodontia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Santo Amaro sob orientação do Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk.

SÃO PAULO

2008

ENNYO SOBRAL CRISPIM DA SILVA

AVALIAÇÃO DA SUPERFÍCIE TRATADA DE IMPLANTES DENTAIS POR
MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Odontologia à Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro.
Área de Concentração Implantodontia.

Data de Aprovação ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Wilson Roberto Sendyk (orientador)
Livre Docente pela Faculdade de Odontologia da
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Manoela Domingues Martins
Doutora em Patologia Bucal pela
Universidade de São Paulo - USP

Roberto Lyra de Brito
Doutor em Odontologia Preventiva Social pela
Faculdade de Odontologia de Pernambuco – FOP/PE

CONCEITO FINAL: _____

Dedico este trabalho

Aos meus pais, **Celestino** e **Graça**, meus irmãos **Dennys** e **Sheylla** e minha namorada **Paula**, que me apoiaram e deram força nos momentos que eu mais precisei e acreditaram que seria possível chegar até aqui

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, causa primeira de todas as coisas

Às amigas **Soraia Hadad, Renata Cançado, Adriana e Vanessa Dalapria e Renata Sousa Silva**, que confiaram em mim como profissional e me apoiaram nessa jornada.

Ao professor e orientador **Wilson Roberto Sendyk**, por toda a paciência e colaboração, sempre procurando enriquecer o nosso trabalho e pela acolhida e apoio no curso de mestrado da UNISA.

À professora **Patrícia Ramos Cury**, pela imprescindível colaboração com as células, sem as quais, nada teria sido possível.

À **Pollyanna Montaldi**, por todo auxílio no manuseio das células e paciência em elucidar todos os nossos questionamentos.

Às empresas **BTLock, SIN e TitaniumFix** que acreditaram em nosso trabalho e nos cederam seus implantes para o nosso estudo.

Às queridas **Antonia Maria Ferreira Lima e Adriane Cristina Sarti Sprogis** do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da UNICAMP, pelo profissionalismo demonstrado e apoio técnico ao nosso trabalho.

Ao professor **Casemiro Fernando Soares Leite**, pela paciência e auxílio prestado com as estatísticas.

Ao amigo **Antonio Hernandes Chaves Neto**, pela inestimável e desprendida colaboração que foi tão importante no momento da execução deste trabalho.

Aos amigos **Orlando Viscardi Jr.** e **Ely Silva Martins**, por toda a ajuda e apoio junto às empresas de implante SIN e BTLock para obtenção dos materiais utilizados em nosso trabalho.

Aos **colegas do Mestrado**, com quem aprendi muito nesse período de convivência e que fizeram toda a nossa caminhada mais divertida e descontraída.

Aos **funcionários** da UNISA e do Laboratório de Patologia da Faculdade São Leopoldo Mandic pela dedicação em todos os momentos.

*“Na ignorância não conseguiríamos como não conseguiremos,
enxergar o caminho que Deus traçou a cada um de nós na Terra.
Todos nós, sejamos crianças ou jovens, adultos ou já muitíssimo
maduros, devemos estudar sempre.”*

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi observar o desempenho de três diferentes superfícies de implantes dentários de uso comercial, jateamento e duplo ataque ácido (BTLock), jateamento e ataque ácido (TitaniumFix) e duplo ataque ácido (SIN), comparadas ao grupo controle (laminulas de vidro) frente à cultura de osteoblastos humanos da linhagem SJS-1. Foram utilizados implantes de tamanhos 5,0x8,5mm e 5,5x8,0mm e laminulas de vidro com 13mm de diâmetro, nos quais foram plaqueadas $13,2 \times 10^4$ células. Os grupos foram avaliados através da adesão celular em 2 horas por microscopia de luz e da proliferação celular nos períodos de 24 horas, 72 horas e 7 dias por microscopia de luz e eletrônica de varredura (MEV). Os resultados estatísticos não apontaram diferenças significativas entre os grupos para a adesão celular. Para a proliferação celular em microscopia de luz, a superfície tratada por jateamento e duplo ataque ácido mostrou desempenho significativamente melhor que as demais no período de 24 horas, enquanto nos períodos de 72 horas e 7 dias, o grupo controle obteve melhores médias, mas sem diferenças significativas entre os grupos. Na análise através da MEV, no período de 24 horas a superfície com o tratamento por duplo ataque ácido mostrou-se melhor, enquanto nos períodos de 72 horas e 7 dias, não existiu diferença significativa entre as superfícies. Observou-se que o tipo de tratamento de superfície não influenciou a resposta da adesão celular e também que a tripsina não se mostrou como um meio eficiente para a liberação das células da superfície dos implantes para a contagem em microscopia de luz.

Palavras-chave: implantes dentários, titânio, técnicas de cultura de células, osteoblastos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to compare three different surfaces of dental implants commercially available, sandblasted and double acid-etched (BTLock), sandblasted and acid-etched (TitaniumFix) and double acid-etched (SIN), and the osteoblast cell behavior compared to control group (glass disks) using SJSA-1 cells. Dental implants with 5.0x8.5mm and 5.5x8.0mm sizes, glass disks with 13 mm of diameter were used and 13.2×10^4 cells were seeded on them. The groups were evaluated by cell adhesion after 2 hours using optic microscopy, and by cell proliferation after 24 hours, 72 hours and 7 days using optic and scanning electron microscopy (SEM). Statistical analysis not showed differences among the groups in adhesion. For cell proliferation in optic microscopy, the sandblasted and double acid-etched was better than other at 24 hours, but for 72 hour and 7 days, the control group showed the best means, but without significantly differences among the groups. Proliferation analysis by SEM showed, at the 24 hours period, that the double acid-etched surface had the best performance and at 72 hours and 7 days, there were not significantly differences among the groups. The surface treatment do not influenced the cell adhesion response and the trypsin was not efficient to complete removal the cells attached on implant surface to the optical cell evaluation.

Keywords: dental implants, titanium, cell culture techniques, osteoblasts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Micrografia das superfícies dos implantes: (a) jateamento com duplo ataque ácido (BTLock); (b) jateamento com ataque ácido (Titanium Fix); (c) duplo ataque ácido (SIN)....	47
Figura 02	Frasco de cultura celular.....	48
Figura 03	Implantes já estabilizados na placa de seis poços e as células sendo plaqueadas.....	49
Figura 04	Imagem da câmara de Neubauer (a) em microscópio invertido onde se observam células viáveis (citoplasma claro) e inviáveis (citoplasma escuro) (b).....	50
Figura 05	Representação esquemática da câmara de Neubauer vista ao microscópio. Conta-se as células que se apresentam nos quadrantes iguais ao destacado na figura (Imagem obtida na internet no endereço www.icb.usp.br/~bmm/materiais/P3a%20%20Contagem%20de%20celulas%20em%20camara%20de%20Neubauer.pdf).....	51
Figura 06	(a) Amostras preparadas para a secagem; (b) Ponto crítico	52
Figura 07	Representação esquemática da divisão dos implantes com Ø 5.0 em 3 terços: cervical, médio e apical.....	53
Figura 08	Tubo eppendorf com implante ainda imerso na suspensão celular.....	53
Figura 09	Gráfico representando as médias da adesão celular nas superfícies controle e tratadas dos implantes de titânio.....	58
Figura 10	Gráfico representando a comparação entre as médias das células aderidas com relação às plaqueadas nos grupos controle, BTLock, Titanium Fix e SIN.....	60
Figura 11	Gráfico representando as médias dos valores de proliferação dos grupos, obtidos por microscopia de luz em 24 horas de proliferação.....	62
Figura 12	Gráfico representando as médias dos valores de proliferação dos grupos, obtidos por microscopia de luz em 72 horas de proliferação.....	63
Figura 13	Gráfico representando as médias dos valores de proliferação dos grupos, obtidos por microscopia de luz em 7 dias de proliferação.....	64

Figura 14	Micrografia com aumento de 300x evidenciando a contagem das células aderidas em sua superfície.....	65
Figura 15	Gráfico representando as médias dos valores de proliferação dos grupos, obtidos por MEV em 24 horas de proliferação.....	67
Figura 16	Gráfico representando as médias dos valores de proliferação dos grupos, obtidos por MEV em 72 horas de proliferação.....	68
Figura 17	Gráfico representando as médias dos valores de proliferação dos grupos, obtidos por MEV em 7 dias de proliferação.....	70
Figura 18	Gráfico de tendência das médias dos grupos obtidas por microscopia de luz nos períodos de proliferação analisados	71
Figura 19	Gráfico de tendência das médias dos grupos obtidas por microscopia eletrônica nos períodos de proliferação analisados.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Apresentação dos dados correspondentes às amostras utilizadas.....	46
Tabela 02	Distribuição do número de amostras com relação aos testes realizados.....	47
Tabela 03	Resultado da contagem da adesão celular nos implantes por microscopia de luz.....	56
Tabela 04	Resultado da contagem da adesão celular nas lamínulas por microscopia de luz.....	57
Tabela 05	Resumo da análise estatística ANOVA dos dados da microscopia de luz para a adesão celular dos grupos Controle, BTLock, TitaniumFix e SIN.....	57
Tabela 06	Teste ANOVA dos dados obtidos da adesão celular por microscopia de luz para os grupos analisados.....	57
Tabela 07	Teste-t para o grupo controle.....	58
Tabela 08	Teste-t para o grupo BTLock.....	59
Tabela 09	Teste-t para o grupo TitaniumFix.....	59
Tabela 10	Teste-t para o grupo SIN.....	59
Tabela 11	Resumo dos dados estatísticos da análise em microscopia de luz para a proliferação celular no período de 24h dos grupos Controle, BTLock, TitaniumFix e SIN	61
Tabela 12	Teste ANOVA dos dados obtidos da proliferação celular por microscopia de luz para os grupos analisados no período de 24 horas.....	61
Tabela 13	Resultados do teste Tukey-Kramer para amostras avaliadas pela microscopia de luz no período de 24 horas de proliferação.....	61
Tabela 14	Resumo dos dados estatísticos da análise em microscopia de luz para a proliferação celular no período de 72h dos grupos Controle, BTLock, TitaniumFix e SIN	62
Tabela 15	Teste ANOVA dos dados obtidos da proliferação celular por microscopia de luz para os grupos analisados no período de 24 horas.....	63

Tabela 16	Resumo dos dados estatísticos da análise em microscopia de luz para a proliferação celular no período de 7 dias dos grupos Controle, BTLock, TitaniumFix e SIN.....	64
Tabela 17	Teste ANOVA dos dados obtidos da proliferação celular por microscopia de luz para os grupos analisados no período de 7 dias.....	64
Tabela 18	Resumo dos dados estatísticos da análise em MEV para a proliferação celular no período de 24 horas dos grupos Controle, BTLock, TitaniumFix e SIN.....	66
Tabela 19	Teste ANOVA dos dados obtidos da proliferação celular por MEV para os grupos analisados no período de 24 horas.....	66
Tabela 20	Resultados do teste Tukey-Kramer para amostras avaliadas pela MEV no período de 24 horas de proliferação.....	66
Tabela 21	Resumo dos dados estatísticos da análise em MEV para a proliferação celular no período de 72 horas dos grupos Controle, BTLock, TitaniumFix e SIN.....	67
Tabela 22	Teste ANOVA dos dados obtidos da proliferação celular por MEV para os grupos analisados no período de 72 horas.....	68
Tabela 23	Resumo dos dados estatísticos da análise em MEV para a proliferação celular no período de 7 dias dos grupos Controle, BTLock, TitaniumFix e SIN.....	69
Tabela 24	Teste ANOVA dos dados obtidos da proliferação celular por MEV para os grupos analisados no período de 7 dias	69
Tabela 25	Resultados do teste Tukey-Kramer para amostras avaliadas pela MEV no período de 24 horas de proliferação.....	69
Tabela 26	Médias das amostras obtidas por microscopia de luz e MEV.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	-	Graus Celsius
∅	-	Diâmetro
µm	-	Micrômetros
Al ₂ O ₃	-	Óxido de Alumínio
BIC	-	Bone Implant Contact (Contato Osso Implante)
Co-Cr-Mo	-	Cobalto-Cromo-Molibdênio
d	-	Densidade
EBM	-	Electron Beam Melting (fusão em forno por feixe de elétrons)
ECM	-	Extracellular matrix (matriz extracelular)
EDS	-	Espectroscopia de energia dispersiva
g/cm ³	-	Gramas por centímetro cúbico
HA	-	Hidroxiapatita
HNO ₃	-	Ácido nítrico
J/cm.K	-	Joules por centímetro Kelvin
M	-	Molar (Massa Molar – massa de uma mol de partículas de determinada substância)
MEV	-	Microscópio ou microscopia eletrônica de varredura
modSLA	-	Superfície SLA modificada
MPa	-	Mega Pascal
MTT	-	Azul de tetrazolium
N/mm ²	-	Newton por milímetros quadrados
N ₂	-	Gás nitrogênio
NaCl	-	Cloreto de Sódio
nm	-	Nanômetros
pH	-	Potencial hidrogeniônico
R _a	-	Média da rugosidade da superfície
RGD	-	Arg-Gly-Asp (Arginina-Glicina-Ácido aspártico)
RPMI	-	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	-	Transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase
RTV	-	Removal torque values (valores do torque de remoção)

SLA	-	Sandblasted, large grit, acid-etched (jateadas com partículas de granulação grande seguida por ataque ácido)
TI	-	Titânia (titânio isostaticamente comprimido)
Ti	-	Titânio
Ti/HA	-	Titânio/Hidroxiapatita
Ti-6Al-4V	-	Titânio – 6% de Alumínio – 4% de Vanádio
Ti-6Al-7Nb	-	Titânio – 6% de Alumínio – 7% de Nióbio
TiCP	-	Titânio comercialmente puro
TiO ₂	-	Óxido de titânio
TiO ₂ /HA	-	Óxido de Titânio/Hidroxiapatita
Tiv	-	Tivanium [®]
TPS	-	Titânio Plasma Spray
U/mL	-	Unidades por mililitros
UNICAMP	-	Universidade Estadual de Campinas
Zim	-	Zimaloy [®]

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
	2.1 A UTILIZAÇÃO DO TITÂNIO NA MEDICINA E NA ODONTOLOGIA.....	20
	2.2 TOPOGRAFIA DE SUPERFÍCIE DOS IMPLANTES.....	22
	2.3 TESTES DE SUPERFÍCIE.....	26
3	PROPOSIÇÃO	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
	4.1 IMPLANTES DENTAIS.....	46
	4.2 CULTURA CELULAR.....	47
	4.3 ADESÃO CELULAR.....	49
	4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	51
	4.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	53
5	RESULTADOS	55
	5.1 ADESÃO CELULAR.....	56
	5.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	60
	5.2.1 MICROSCOPIA DE LUZ	60
	5.2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	65
	5.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM A MICROSCOPIA DE LUZ E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	70
6	DISCUSSÃO	72
	6.1 DISCUSSÃO DO MÉTODO.....	73
	6.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	75
7	CONCLUSÃO	80
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
9	ANEXOS	89

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Com as pesquisas realizadas na Universidade de Gotemburgo no início dos anos 1960 por Brånemark e colaboradores, desenvolveu-se um novo implante que, pelo processo de osseointegração, solucionava o problema de ancoragem protética e devolvia ao indivíduo a sua função mastigatória. Nascia, a partir daí, uma nova era na Odontologia moderna. O que se buscava há muito, fora finalmente atingido: a terceira dentição.

Por ser um material biocompatível, o titânio possui “a habilidade de executar, com uma resposta apropriada, uma aplicação específica” (WILLIAMS, 1987 e 1994), permitindo a completa osseointegração, que seria a deposição de osso remodelado vivo sobre a superfície do implante sem a interposição de nenhum tipo de tecido fibroso nessa interface. Com os implantes de Brånemark, conseguia-se que o paciente tivesse restituída sua estética e a função, voltando a possuir assim, uma dentição fixa e confiável. No entanto, alguns pré-requisitos eram necessários para que o mesmo pudesse ser submetido ao tratamento com implantes. Tais implantes necessitam de certo tempo para que haja a formação e deposição óssea sobre a sua superfície possibilitando o uso dos mesmos como suporte para próteses.

Durante os últimos 30 anos, o uso de implantes osseointegrados se tornaram uma modalidade de tratamento cientificamente aceitos e bem documentados para a reabilitação de pacientes completamente ou parcialmente edêntulos. Este desenvolvimento é baseado nos estudos fundamentais das equipes de Brånemark et al e Schroeder et al de implantes de titânio comercialmente puros (BUSER et al, 1998).

O tempo de osseointegração passou a ser crucial para o tratamento com implantes. Implantes na maxila necessitam de 6 a 8 meses para que ocorra sua completa osseointegração, o que, juntamente com o tempo de reabertura e as sessões de confecção da prótese, aumentam o tempo total do tratamento. Para os pacientes mais idosos, um tempo de tratamento mais prolongado possui um peso muito maior que para pacientes jovens, já que suas expectativas de vida são bem diferentes.

Dessa forma, os estudos se voltaram para o desenvolvimento de substâncias que modificassem a superfície dos implantes intencionando a redução do tempo de osseointegração.

O tratamento da superfície do implante tem por fim melhorar a fixação do implante favorecendo a integração óssea. À medida que alguns artigos passaram a revelar fracassos significativos dos implantes com superfícies lisas, quando instalados em maxilares com pouca altura de rebordo alveolar e com baixa densidade óssea (osso tipo IV), incrementou-se a pesquisa e o desenvolvimento das superfícies texturizadas (NAGEM FILHO et al, 2007).

Variadas formas de modificação da superfície lisa (usinada) dos implantes para uma superfície tratada foram desenvolvidas pelas empresas. A superfície tratada tem sua área de contato aumentada, o que permite uma maior interação com o osso e com as células, já que pesquisas comprovaram que é de considerável importância para a osseointegração os eventos celulares e moleculares do período de cicatrização inicial pós-cirúrgico.

Como consequência, durante os últimos 20 anos, um grande número de sistemas de implantes com diferentes topografias de superfície foram introduzidos (SHALABI et al, 2006).

Os esforços atuais para aumentar a formação óssea em implantes endósseos de titânio incluem a recente introdução de implantes dentais com topografias de superfícies únicas (COOPER et al, 1999).

Estudos *in vitro* têm sido usados na investigação das interações célula-substrato para entender os efeitos dos materiais nos meios biológicos aos quais são inseridos. Esse tipo de estudo é muito útil para análises detalhadas do comportamento celular em contato com biomateriais, especialmente o titânio, o qual é o metal mais frequentemente usado para a confecção de implantes dentais e ortopédicos (GALLI et al, 2005).

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A UTILIZAÇÃO DO TITÂNIO NA MEDICINA E NA ODONTOLOGIA

Parr, Gardner e Toth (1985) afirmam que o titânio (Ti) existe como elemento puro listado na tabela periódica com número atômico 22 e peso atômico de 47,9. É o nono elemento mais abundante e o quarto elemento metálico estrutural mais abundante na crosta terrestre, seguido pelo alumínio, ferro e magnésio. As ligas de titânio de interesse para a odontologia existem em três formas: alfa, beta e alfa-beta. As usadas mais comumente, segundo os autores, são as variedades alfa-beta. Dessas, a mais comum contém 6% de alumínio e 4% de vanádio (Ti-6Al-4V). O alumínio aumenta a força e diminui o peso da liga. O vanádio é um estabilizador da fase beta, reduz a suscetibilidade a corrosão, provavelmente pela supressão da formação de compostos $TiAl_3$. Essas ligas, especialmente a alfa-beta, podem ser tratadas com calor para ter sua força aumentada. De acordo com os autores, elas são leves, fortes, resistentes à fadiga e corrosão. Apesar de serem mais duras que o osso, seu módulo de elasticidade é mais próximo do osso do que qualquer outro metal importante; a única exceção é o Ti puro.

Um alto grau de biocompatibilidade, força e resistência à corrosão faz do titânio, segundo Donley e Gillette (1991), ideal para implantes orais. A adesão química entre a camada do óxido da superfície do implante de titânio e o epitélio foi demonstrada *in vivo* e *in vitro*. Essa adesão, de acordo com os autores, é mediada por uma glicoproteína similar à encontrada na adesão entre o epitélio e as superfícies dos dentes naturais. Quando exposto ao ar, o titânio reage formando uma camada de óxido de titânio imediatamente (10^{-9} segundos) que alcança a espessura de 2 a 10 nm, o que fornece resistência à corrosão.

Williams (1994), em seu editorial ressalta outros trabalhos publicados por ele e sua equipe em anos anteriores (1973, 1982, 1987) sobre o titânio, nos quais afirma que o uso cirúrgico do metal começou há mais de 50 anos e ele tem sido usado na ortopedia desde a metade dos anos 60. Dessa forma, o titânio comercialmente puro (TiCP) se tornou conhecido como o metal não-

nobre mais resistente a corrosão, propriedade que resulta da camada de óxido inerte que se forma espontaneamente em sua superfície. Também se tornou aparente que uma resistência à corrosão similar a essa possa ser atingida por algumas ligas de titânio, como a titânio – 6% alumínio – 4% vanádio, a qual possui uma força mecânica muito superior. A reputação do titânio como um material 'biocompatível' foi baseada em sua excelente resistência à corrosão, a qual limita severamente a quantidade de íons de titânio liberados no tecido na maioria das circunstâncias.

Howard e Timothy (1995) apud Teixeira (2001) afirmam que o elemento químico titânio, com número atômico 22 na tabela periódica dos elementos, apresenta comprovada biocompatibilidade; alta resistência à tração (200 a 700 MPa), comum aos metais; baixo peso específico ($d = 4,5 \text{ g/cm}^3$ a 25°); alto ponto de fusão (1688°C); módulo de elasticidade compatível com tecidos orgânicos (105.200 N/mm^2), dureza Vickers entre 80 e 105, dependendo do grau do metal; condutividade térmica $0,2 \text{ J/cm.K}$ e expansão térmica $9,6 \times 10^{-7} \text{ K}^{-1}$; e talvez sua principal corrosão em meio orgânico, devido à estabilidade química da camada de óxidos formada em sua superfície, imediatamente após a exposição do metal puro ao meio externo.

Segundo Teixeira (2001), o módulo de elasticidade do titânio torna-se característica importante para seu uso como biomaterial em Implantodontia, visto que seu módulo de elasticidade fica próximo ao do osso compacto (30.000 a 100.000 N/mm^2), permitindo um comportamento mecânico (deformação) semelhante ao do conjunto composto pela peça metálica e pelo tecido calcificado quando submetido às forças fisiológicas da mastigação. Quanto ao óxido de superfície, o autor nos traz que os mais presentes na camada superficial do titânio comercialmente puro (TiCP) são Ti_2O_3 , TiO e TiO_2 , sendo o último o principal componente

Linez-Bataillon et al (2002) afirmam que, de fato, as ligas baseadas no titânio trazem propriedades mecânicas interessantes. A camada passiva na superfície da liga gera uma excelente resistência à corrosão e uma biocompatibilidade quase perfeita.

De acordo com Sader et al (2005), as ligas de titânio, assim como o próprio titânio, têm sido largamente usadas durante os últimos vinte anos como materiais biomédicos na ortopedia e nas cirurgias odontológicas devido a sua

alta resistência a corrosão, bem como a sua propriedade de biocompatibilidade.

Segundo Qu et al (2007), no campo dos implantes dentais, os dispositivos de titânio têm uma longa e bem sucedida história de uso, com excelente performance em termos de segurança no uso e estabilidade a longo prazo.

Ponader et al (2008) afirmam que, exposto ao oxigênio, o titânio é espontaneamente coberto por uma camada de óxido na superfície, uma propriedade a qual contribui, em parte, para sua excelente biocompatibilidade, incluindo baixa toxicidade, alta estabilidade com baixas taxas de corrosão e propriedades mecânicas favoráveis quando comparado a outros metais.

2.2 TOPOGRAFIA DE SUPERFÍCIE DOS IMPLANTES

Em seu artigo, Kasemo (1983) teve como propósito realizar uma breve identificação e discussão das propriedades físico-químicas sob os seguintes tópicos: preparação do implante; composição química e cristalográfica da superfície do implante; propriedades químicas e processos químicos na interface biotécidos-inorgânicos. Os processos biológicos resultantes da instalação de um implante inorgânico em um indivíduo vivo originam interações químicas que acontecem na interface entre o implante e os tecidos desse indivíduo. Quando os implantes metálicos são usados, a interação química é determinada pelas propriedades do óxido de superfície e não pelas propriedades químicas do metal. Fatores que contribuem para os resultados de sucesso com o titânio puro como material para implante podem ser uma combinação da inércia, a alta constante dielétrica e algumas outras propriedades bioquímicas específicas do óxido.

Brunette (1988) afirma que o osso se adapta intimamente na superfície dos implantes independente de serem lisos ou porosos, cerâmica ou titânio, ou de uma grande variedade de outras superfícies. Afirma ainda que a porosidade, então, não é uma condição necessária para que haja deposição óssea no

implante, mas é provável que tenha algum papel na taxa de fixação do implante.

Kasemo e Lausmaa (1988) em seu artigo traçam um paralelo entre a superfície do implante e os tecidos adjacentes. Segundo os autores, se a superfície do implante é extremamente hidrofílica, proteínas com sua porção hidrofóbica “enxergarão” essa superfície como água, interagindo, provavelmente, indiretamente com a mesma através de uma camada intermediária de água. De outra forma, se a superfície for hidrofóbica, a proteína poderá interagir diretamente com a superfície. A natureza da camada de biomoléculas na superfície irá determinar como a célula responderá a isso. Durante os primeiros segundos após a implantação, essencialmente existe apenas água, íons dissolvidos e biomoléculas mais próximo da superfície (mas sem células). As propriedades iniciais da superfície do implante, de maneira decisiva, determinam a natureza e propriedades da camada de água e biomoléculas que eventualmente adsorvem nela. Esta, por sua vez, influencia o comportamento das células quando elas atingem a superfície. Elas podem, por exemplo, reagir e modificar a camada adsorvida na superfície. A interação na superfície é como uma série de eventos acontecendo em espaço e tempo, os quais são de certa maneira crucialmente influenciados pelas propriedades da superfície original do implante.

Segundo Buser et al (1998), entre as superfícies de implantes já testadas, uma nova superfície tratada por jateamento seguido com ataque ácido (SLA) mostrou consistentemente os melhores resultados tanto no teste histométrico como no biomecânico.

Cooper (2000) realizou revisão de trabalhos experimentais publicados e as modificações clinicamente relevantes da superfície do TiCP em termos de possíveis vantagens e desvantagens atribuídas a essas superfícies alteradas por subtração ou adição e concluiu que os implantes de superfície maquinada não são “lisos” e nem todas as superfícies “rugosas” são equivalentes. As superfícies são, em sua maioria, identificadas pelo método de modificação e os diferentes métodos de modificação podem levar a superfícies que têm respostas biológicas semelhantes.

Em estudo realizado por Okumura et al (2001), os autores ressaltam que o titânio (Ti) e a hidroxiapatita (HA) são usados clinicamente para implantes

dentais desde que ambos foram considerados biocompatíveis. Assim, numerosos estudos têm sugerido a superioridade dos implantes com cobertura de HA para a osseointegração e formação óssea. Uma mineralização forte e rápida na superfície da HA pode ser a responsável pelo sucesso cirúrgico alcançado com os implantes com cobertura de HA. Apesar das diferenças nas taxas de sucesso clínico, não está claro como as superfícies dos materiais dos implantes promovem ou inibem a osteogênese.

Jayaraman et al (2004) ressaltam que embora seja bem aceito que a topografia de superfície dos implantes tem uma influência marcante na osseointegração, pouco se sabe sobre o efeito da rugosidade da superfície no metabolismo celular ou diferenciação de células osteoblásticas interagindo com os implantes. Segundo os autores, a matriz extracelular (ECM) é crucial na mediação da adesão celular aos biomateriais e sua organização e produção determinam o grau de adesão celular aos materiais.

De acordo com Szmukler-Moncler, Testori e Bernard (2004), o ataque ácido é um método subtrativo, em que depressões são criadas na superfície do titânio. A topografia da superfície obtida pelo ataque ácido pode ser modulada de acordo com o tratamento anterior, por exemplo, o jateamento, além do uso de misturas de ácidos com diferentes temperaturas e diferentes tempos de cauterização.

Wennerberg, Albrektsson e Lindhe (2005) afirmam que com base em estudos experimentais, os fabricantes de implantes sugeriram que a modificação das superfícies dos implantes dentários poderiam ser submetidas ao carregamento após a cirurgia em tempos inferiores aos recomendados aos implantes usinados. Assim, segundo os argumentos utilizados para justificar a modificação da superfície dos implantes, os autores asseveram que eles (1) garantem melhor estabilidade mecânica entre o osso e o implante imediatamente após a instalação – o que é possibilitado por uma área de contato maior, (2) fornecem, ainda, uma configuração da superfície que permite a retenção de coágulo e (3) estimulam o processo de cicatrização. Os autores concluem que exemplos de métodos usados para alterar a topografia da superfície dos implantes dentários comercialmente disponíveis incluem *jateamento, plasma spray com partículas de titânio, ataque químico e/ou*

revestimento. Esses métodos de tratamento criam *irregularidades de altura, distâncias entre ondulações e dimensões espaciais*.

Groisman e Vidigal Jr. (2005) afirmam que os ótimos resultados clínicos dos estudos de longo-prazo realizados por Brånemark e colaboradores, onde os implantes com superfície usinada eram instalados somente nas regiões anteriores da mandíbula e maxila, não foram alcançados da mesma forma no momento em que os implantes com essa superfície passaram a ser utilizados nas regiões posteriores. Tal limitação, motivada também pela possibilidade de um uso precoce de cargas protéticas nos implantes, estimulou a pesquisa e desenvolvimento de novas superfícies de implantes. Os materiais de fosfato de cálcio, principalmente a hidroxiapatita (HA), uma apatita carbonada, assemelham-se à fase mineral do osso, apresentaram melhores resultados *in vitro* e *in vivo*, além de formarem uma superfície mais rugosa que a do titânio usinado.

Nagem Filho et al (2007) afirmam que a rugosidade superficial é um fator importante para a escolha do implante porque aumenta a área de osseointegração no contato osso implante. O jateamento da superfície do implante promove macrorrugosidade na textura e o ataque ácido além de promover macrorrugosidade, elimina a contaminação e o estado hidrofóbico da superfície, permitindo melhor adsorção das proteínas. A conservação da hidrofília na superfície do implante depende de seu armazenamento em solução isotônica, que evita a contaminação com a atmosfera.

Chiesa et al (2007) afirmam que, atualmente, os implantes endósseos provaram ser bem sucedidos e previsíveis na reabilitação de pacientes com osso pobre e daqueles parcialmente ou completamente edêntulos. Um dos fatores chave para o sucesso desses implantes é a obtenção de um contato íntimo entre o osso e a superfície do implante. Segundo os autores, a interface implante-osso deveria ser capaz de promover a aposição de novo osso pela própria ativação de funções bioquímicas.

A superfície do implante, segundo Qu et al (2007), tem sido reconhecida como um fator crítico para o sucesso do uso dos implantes de titânio. A rugosidade e topografia de superfície têm se mostrado ser a maior variável determinando a resposta celular.

De acordo com Ponader et al (2008), o processo de manufatura determina a rugosidade da superfície do material. Uma variedade de processos de fabricação foram estabelecidos, resultando em implantes de superfícies lisas, porosas e rugosas.

2.3 TESTES DE SUPERFÍCIE

Denissen et al (1989) realizaram um estudo em um período de 11 anos de uso clínico de implantes de hidroxiapatita. Implantes robustos feitos a partir do pó da cerâmica de hidroxiapatita foram instalados no alvéolo pós-exodontia em duas categorias de pacientes: na primeira, os implantes foram deixados submersos; na segunda categoria, os implantes também foram instalados pós-exodontia e, por cima deles, instalados próteses fixas de 3 ou 4 elementos. Além desses, foram instalados implantes de titânio com partículas cimentadas de cerâmica de hidroxiapatita também em duas categorias de pacientes: desdentados totais que receberam 4 implantes nos quais foram instalados overdentures e pacientes com um ou dois dentes perdidos que receberam coroas posteriormente. O estudo demonstrou que os implantes cilíndricos de hidroxiapatita são dispositivos confiáveis como naturais substitutos das raízes que aderem diretamente ao osso ao invés de simplesmente serem osseointegrados.

Davies, Lowenberg e Shiga (1990), em vista da necessidade de criar modelos de sistemas para examinar com precisão as reações na interface entre as células ósseas e as superfícies metálicas, os autores desenvolveram e descreveram uma técnica *in vitro* baseada na cultura de células ósseas da medula de ratos. Tal método pode não apenas reproduzir características morfológicas conhecidas por ocorrer *in vivo* na interface metal/osso, mas também permite examinar essas reações com resolução maior que em estudos anteriores. Para o estudo, discos de TiCP (5 mm de diâmetro e 1 mm de espessura) foram preparados, receberam acabamento manual (granulação 600), em seguida mantidos em cuba ultra-sônica por um período de 1h em Decon 2%, lavados, e então imersos por mais 1 hora em ácido nítrico. Os

discos foram plaqueados com as células e mantidos em meio de cultura por 2 a 3 semanas. Os resultados obtidos pelos autores demonstram que o tecido ósseo pode crescer, em cultura, diretamente sobre discos de TiCP e o tecido mineralizado formado seguiu as ranhuras deixadas pelo disco de acabamento usado no tratamento da superfície. A interface formada pela matriz extracelular entre as células e a superfície se mostrou muito similar à descrita *in vivo*.

Em seu estudo histomorfométrico com mini porcos, Buser et al (1991) instalaram cilindros ocos de titânio com seis superfícies diferentes na tíbia e fêmur dos animais. Após 3 a 6 semanas, os implantes com o osso ao seu redor foram removidos e analisados em cortes transversos descalcificados. A análise histomorfométrica indicou diferenças significantes na porcentagem de contato osso-implante. A maior extensão da interface osso-implante foi observada nas superfícies tratadas com jateamento e ataque ácido, da mesma forma que nas superfícies cobertas por hidroxiapatita (HA). Contudo, a cobertura de HA mostrou consistentes sinais de reabsorção. Concluíram, então, que a extensão da interface osso-implante está positivamente correlacionada com um aumento da rugosidade da superfície do implante.

O estudo de Bowers et al (1992) teve como objetivo melhor entender os efeitos da rugosidade de superfície nas respostas biológicas *in vitro* das células osteoblásticas. Discos de titânio receberam o tratamento de jateamento, ataque ácido, além da produção de superfície rugosa através de polimento com papel metalográfico com granulação 60, 120 e o controle, com 600. As células foram semeadas e mantidas em cultura entre 14 e 21 dias. Concluíram os autores, que o tipo de rugosidade produzida em uma superfície de TiCP influencia a resposta biológica inicial bem como a adesão e espalhamento celular. Afirmam ainda que uma superfície rugosa irregular produzida por jateamento parece ser mais condutiva para a adesão celular do que as outras superfícies rugosas produzidas por polimento/abrasão ou ataque ácido.

Groessner-Shreiber e Tuan (1992) em seu estudo isolaram enzimaticamente células ósseas da calvária de embriões de galinha que foram plaqueadas em discos de liga de titânio com superfície lisa (polidas com cetim), rugosa-texturizada ou com cobertura porosa convencional e o controle foi feito em lamínulas de vidro e nas placas de poliestireno para cultura de tecidos. O objetivo dos autores era avaliar como superfícies de titânio similares às

comumente usadas em implantes ortopédicos podem influenciar as atividades biológicas das células ósseas. Concluíram que as características físicas de ambas as superfícies, rugosas e com cobertura porosa, aumentam substancialmente o processo de mineralização pelas células ósseas. Esse efeito é mais provável ser de uma significância mecânica para a estabilidade dos implantes ortopédicos e dentais de titânio.

Li (1993), em seu estudo, comparou a biocompatibilidade do TiCP e dos materiais baseados em titânio *in vivo* pela medida do torque de remoção em 1 e 3 meses após implantação em fêmur de coelho, e a estabilidade desses materiais *in vitro* pela medida da liberação de íons em diferentes soluções. Cilindros (2,8 x 6 mm) de titânia (TI – titânio isostaticamente comprimido) e compósito de titânio-hidroxiapatita (Ti/HA), sinterizada¹ por calor isostático sob pressão a 925°C e TiCP, foram processadas por máquinas ultra-sônicas. Três cilindros foram implantados em fêmures de 10 coelhos, os quais foram sacrificados em 1 e 3 meses após a implantação. A rugosidade e a liberação de íons desses materiais foram avaliadas *in vitro*. Os resultados obtidos pelo autor foram de que titânia (TI) e o TiCP possuem força de adesão com o osso semelhantes por possuírem superfície quimicamente inerte; o compósito Ti/HA mostrou maior força de adesão óssea que o titânia (TI) e o TiCP após 1 e 3 meses de implantação; bem como que o titânia (TI) se mostrou mais estável em níveis mais baixos de pH.

Na tentativa de entender as respostas em curto prazo *in vitro* das células osteoblásticas às superfícies tratadas do TiCP e da liga de Ti, Keller et al (1994), analisaram o nível de adesão celular em tais superfícies, as quais aconteceram com maior intensidade nas superfícies rugosas jateadas, porém, estatisticamente, não houve diferença significativa entre as superfícies do TiCP e da liga de Ti, bem como não existiram diferenças na morfologia celular ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). Tais resultados estão consoantes com outras pesquisas realizadas com a mesma metodologia, existindo

¹ A **sinterização** é um processo no qual pós com preparação cristalina ou não, uma vez compactados, recebem tratamento térmico, no qual a temperatura de processamento é sempre menor que a sua temperatura de fusão. Este processo cria uma alteração na estrutura microscópica do elemento base. Isto ocorre devido a um ou mais métodos chamados “*mecanismos de transporte*”: estes podem ser consecutivos ou concorrentes. Sua finalidade é obter uma peça sólida coerente. (Fonte: Wikipédia - <http://pt.wikipedia.org/wiki/Sinteriza%C3%A7%C3%A3o>)

diferenças sutis apenas na composição do óxido de superfície e estrutura (entre o TiCP e a liga de Ti), mas que aparentemente não tem biologicamente influência na resposta celular inicial, adesão e morfologia.

Em seu estudo, Wong et al (1995) investigaram o papel de dois fatores, a topologia de superfície e a composição do metal no processo de osseointegração. Usaram implantes cilíndricos de 6 mm com 1,5 mm de diâmetro que foram implantados em oito lojas cirúrgicas no joelho de porcos miniaturas adultos e foram produzidos com as seguintes especificações: TiCP, Ti-6AL-4V e Ti-6Al-7Nb (Titânio-6%Alumínio-7%Nióbio) com superfícies jateadas com partículas finas, partículas grossas e partículas grossas com ataque ácido; e implantes de Ti-6Al-7Nb com cobertura de HA. Os resultados do seu estudo mostraram que houve fixação dos implantes por aposição direta do osso durante os estágios de regeneração inicial no osso trabecular. A rugosidade de superfície e o passo da rosca se mostraram como importantes parâmetros de superfície para alcançar estabilidade mecânica do implante. Os implantes com cobertura de HA mostraram osseointegração superior em termos dos valores da remoção por tração e aposição óssea. Os autores afirmam existir uma excelente correlação entre a rugosidade média da superfície do implante e o aumento dos valores da remoção por tração.

Yliheikkilä et al (1996) realizaram estudo para examinar o resultado da formação de matriz de mineralização por cultura primária de osteoblastos fetais de mandíbula bovina cultivados em duas diferentes superfícies de implantes e em lamínulas de vidro. Os osteoblastos foram cultivados em discos de cerâmica de hidroxiapatita e em discos de titânio. Segundo os resultados obtidos, a habilidade da cultura primária de osteoblastos em formar qualitativamente matrizes mineralizantes similares 14 dias após plaqueamento não-confluente em diferentes superfícies de implantes sugerem que um comportamento a longo termo dos osteoblastos pode ser auto-direcionado ou fortemente delineado pelas condições da cultura mais do que pela superfície.

Em estudo piloto realizado por Pebé et al (1997), os autores testaram os valores relativos de contra-torque de implantes de superfície tratada jateados com partículas de óxido de titânio, com ataque ácido e superfícies maquinadas. Comparam também a porcentagem de contato ósseo na interface osso-implante histomorfometricamente no microscópio de luz em implantes com e

sem carga e determinaram o grau de correlação entre os valores do contra-torque e o contato de interface para os mesmos implantes com vários graus de rugosidades de superfície. Os autores utilizaram cinco cães vira-lata que tiveram suas mandíbulas posteriores parcialmente edêntulas (extraídos os pré-molares e primeiros molares no mínimo 3 meses antes da colocação dos implantes). Ao menos um implante de cada superfície foi instalado nas áreas edêntulas de pré-molares e dois implantes instalados na área de molares para suportarem duas coroas fixas unidas. Os implantes osseointegraram durante 4 meses antes de receberem carga, restaurados proteticamente em 1 mês e mantidos em carga durante 4 meses. Os animais se alimentaram de comida para cães macia por 1 semana após a cirurgia e com dieta dura após os implantes receberem as coroas e tiveram os dentes escovados mecanicamente uma vez por semana. De acordo com os resultados obtidos, os autores puderam concluir que a força da interface osso-implante, como determinada pelo teste de contra-torque, é influenciada por diferentes características da superfície. As superfícies com o ataque ácido resistiram melhor às forças de contra-torque quando comparadas com as jateadas ou maquinadas. A avaliação histológica do contato ósseo com as várias superfícies não mostrou uma vantagem definitiva para as superfícies rugosas em relação a porcentagem de contato ósseo a nível do microscópio de luz.

Em seu estudo com porcos miniaturas, Buser et al (1998) compararam uma superfície maquinada e tratada com ataque ácido (Osseotite) com outra jateada e tratada com ataque ácido (SLA) em uma análise lado-a-lado na maxila de porcos miniaturas dos valores de torque de remoção após 4, 8 e 12 semanas de implantação. Os autores utilizaram dois diferentes implantes rosqueados com diferentes formas e superfícies implantados em áreas edêntulas da maxila anterior de porcos miniatura. Os resultados apresentaram diferenças significantes ($P < 0,01$) na média dos valores do torque de remoção entre as duas superfícies nos tempos analisados. A média dos valores do torque de remoção para os implantes SLA foi maior (de 75% a 125%) do que a dos implantes Osseotite, ambos com mais de 3 meses de instalação.

No estudo realizado por Buser et al (1998) na maxila de porcos miniaturas, os autores compararam a superfície SLA com duas superfícies de implantes odontológicos de titânio bem documentadas, as maquinadas e as

titânio plasma-spray (TPS). O estudo confirmou que a superfície maquinada teve de 8 a 10 vezes menos torque de remoção (removal torque values - RTV) quando comparada com as duas outras superfícies rugosas e a superfície SLA mostrou maior RTV do que a superfície TPS (sem alcançar significância estatística) durante a regeneração inicial de 4 semanas. As 8 e 12 semanas, ambas as superfícies mostraram valores similares (BUSER et al, 1998 apud BUSER et al, 1998).

Cochran et al (1998) realizaram estudo para avaliar superfícies SLA de implantes através de histomorfométrico em mandíbula de cães. A análise histomorfométrica foi realizada em dois cães após 3 meses de cicatrização (grupo sem carga), 6 meses (3 meses de carga) e após 15 meses (12 meses de carga). Os resultados mostraram maior porcentagem de contato osso-implante nas superfícies SLA com relação às TPS após 3 meses de cicatrização sem carga e após 12 meses com carga (15 meses de cicatrização). Após 3 meses de carga, os autores não notaram nenhuma diferença significativa entre as superfícies. Os resultados obtidos pelos mesmos sugerem que a superfície SLA promove um maior contato ósseo nos tempos iniciais de cicatrização quando comparadas com as superfícies TPS.

Em revisão realizada por Cooper et al (1998) o uso apropriado da cultura celular para avaliar os efeitos no comportamento do osteoblasto durante o processo de osseointegração foi considerado dentro do contexto dos relatos existentes. As interações dos osteoblastos com os substratos, segundo os autores, podem ser medidas em termos de citotoxicidade, adesão, proliferação e diferenciação. Segundo os autores, a formação óssea que ocorre durante o processo de osseointegração pode representar a atividade do osteoblasto afetada pela superfície do implante. A aplicação cuidadosa dos métodos de cultura de osteoblastos e a interpretação cautelosa dos resultados dão apoio à formulação de hipóteses significantes para serem avaliadas *in vivo*.

Em seu estudo, Ahmad, McCarthy e Goronowicz (1999) tentaram estabelecer um sistema modelo osteoblasto-implante para o estudo a longo termo dos eventos celulares e moleculares envolvendo o processo de mineralização em biomateriais e a resposta inicial das células aos implantes. Os autores avaliaram a resposta de células osteoblásticas humanas da osteossarcoma (Saos-2) a discos de duas ligas comerciais (Titanium® - Ti-6Al-

4V; e Zimaloy[®] - Co-Cr-Mo – Cobalto-Cromo-Molibdênio) da maneira como são comercializadas, tendo como controle discos de vidro. Os resultados que obtiveram foi que tanto o Tivanium (Tiv) como o Zimaloy (Zim) suportam a mineralização, enquanto os discos de vidro são um substrato pobre para a mineralização e indicaram que o Tiv estimula uma maior produção de proteínas de matriz extracelular (ECM) do que o Zim ou o vidro nesse tipo de cultura celular.

Em seu estudo, Cooper et al (1999) usaram modelo de osteoblasto mandibular bovino para avaliar o potencial papel da topografia de superfície do titânio no processo de formação de matriz extracelular e mineralização. Os autores utilizaram discos de titânio de 12,5 mm de diâmetro com superfícies maquinadas, jateadas com óxido de titânio (TiO₂) e titânio plasma-spray (TPS). As células foram cultivadas durante 21 dias e as coletas realizadas aos 14 e 21 dias. Concluíram, então, que a topografia de superfície contribui para a modulação do comportamento das células cultivadas. A perturbação da expressão da proteína específica óssea de matriz extracelular e alteração da mineralização da matriz em culturas realizadas em superfícies TPS versus jateadas com óxido ou maquinadas sugerem que a topografia pode modular a diferenciação osteoblástica. Aparentemente, segundo os autores, os eventos biológicos e físico-químicos que condicionam a superfície aloplástica em cultura e modificam a interface osso-implante ocorre em função da topografia de superfície.

Degasne et al (1999) investigaram como as diferentes rugosidades de superfície podem influenciar a adesão, forma e proliferação celular e tentaram determinar o papel da fibronectina e vitronectina e quais os seus locais de ligação específico nas células (integrinas β_1 e α_v). Células da linhagem de osteoblastos humanos Saos-2 foram cultivadas em discos de titânio com dois tipos de superfície: Tipo I, ataque ácido com ácido nítrico por 15 minutos; Tipo II, jateado com sílica e ataque ácido; e no plástico de cultura. As culturas foram mantidas por 24, 48 e 72 horas. Segundo os autores, a proliferação celular foi significativamente maior no plástico de cultura do que em ambas as superfícies de titânio quando da adição da anti β_1 ou α_v integrina subunidade de anticorpo monoclonal no meio de cultura, levando a um aumento nas superfícies rugosas mas não nas superfícies lisas. Esses resultados, de acordo com os autores,

indicam que uma superfície altamente rugosa e a presença de fibronectina ou vitronectina são elementos críticos para a adesão, espalhamento e proliferação das células nas superfícies de titânio.

Lazzara et al (1999) conduziram um estudo histológico humano para comparar a porcentagem de contato osso-implante aos 6 meses para as superfícies Osseotite e a maquinada em implantes de TiCP. Implantes de 2 mm x 5 mm foram desenvolvidos: um lado possuía tratamento Osseotite e o outro era maquinado, para eliminar potenciais influências causadas por diferenças na densidade óssea nas diferentes áreas intra-orais. Onze pacientes receberam um implante teste na maxila posterior (osso Tipo III e IV) durante uma cirurgia normal de implante e, após 6 meses, o implante teste e o osso ao seu redor foram removidos. A análise histológica mostrou que os valores do contato osso-implante foram significativamente maiores ($P < 0,05$) nas superfícies tratadas que o das superfícies maquinadas. Os resultados desse estudo indicam que no osso de qualidade pobre, tipicamente encontrado na maxila posterior, a porcentagem de contato ósseo foi maior nas superfícies Osseotite quando comparadas com as superfícies maquinadas no mesmo implante.

No estudo executado por Mustafa et al (2000), tentou-se determinar o efeito de superfícies jateadas com TiO_2 na resposta biológica de células derivadas do osso da mandíbula de humanos. A morfologia e adesão dessas células foram investigadas em superfícies torneadas (controle), jateadas com partículas de TiO_2 com $45\mu m$ (padrão), $45-63\mu m$ e $63-90\mu m$. As superfícies foram analisadas em MEV. Em geral, as células se espalharam bem em todas as superfícies do titânio, indicando uma boa adesão tanto na superfície lisa quanto na rugosa. Após 1, 3 e 6 horas, a porcentagem de adesão celular não diferiu significativamente entre as superfícies jateadas com $63-90\mu m$ e as superfícies torneadas, mas foi significativamente menor nas superfícies jateadas com partículas de $45\mu m$ ou $45-63\mu m$. Após 24h, as superfícies jateadas com partículas de $63-90\mu m$ tiveram uma maior taxa de adesão celular do que todas as superfícies, incluindo os controles. Os autores concluíram que a adesão e o crescimento das células originárias do osso da mandíbula de humanos *in vitro* são influenciadas pela micro-textura da superfície do implante.

Deligianni et al (2001) tiveram como objetivos em seu trabalho (1) avaliar a influência da rugosidade das superfícies da liga de titânio, Ti-6Al-4V, no

comportamento de células da medula óssea; (2) investigar como as diferenças sutis na rugosidade de superfície pode modificar a resposta a curto e longo prazo do comportamento celular *in vitro*; e (3) explorar a faixa de valores das rugosidades que podem ser sentidas pelos osteoblastos. Assim, examinaram adesão celular, proliferação e diferenciação na liga de Ti usando as placas de petri plásticas como controle. Três valores diferentes de rugosidade de superfície em uma estreita faixa de valores foram usados e uma morfologia regular produzida. As células foram obtidas por aspiração da diáfise de quatro pacientes saudáveis, homens e mulheres entre 50 e 70 anos, e semeados em discos da liga de titânio com superfícies rugosas durante 8, 11, 14 e 16 dias. Concluíram que (a) as células de medula óssea humana podem detectar as mudanças na rugosidade na ordem de 0,60 μm ; (b) rugosidade tem um papel na resposta celular per se, independente da textura de superfície.

Em seu estudo, Lumbikanonda e Sammons (2001) observaram as interações de células ósseas com superfícies de implantes lisas, bombardeadas com dióxido de titânio, recobertas com spray de plasma de titânio e com spray de plasma de hidroxiapatita da maneira como são fabricadas para o uso clínico. Os implantes foram expostos a células osteoblásticas de ratos neonatais em suspensão por um período de 20 minutos e, através da MEV as células aderidas foram classificadas de acordo com o estágio de adesão celular. Segundo os autores, a análise quantitativa mostrou que as células espalharam mais rapidamente nos implantes com o spray de plasma de titânio. As células completamente espalhadas nos implantes de superfície lisa estavam intimamente aderidas à superfície, enquanto na superfície bombardeada com dióxido de titânio não mostraram adaptação nas irregularidades da mesma. Nos implantes cobertos com HA, as células aderiram intimamente apenas nas áreas lisas. As culturas foram mantidas por mais de 4 semanas, permitindo comparação entre a migração celular, proliferação e diferenciação na superfície dos implantes.

Okumura et al (2001) realizaram estudo com células osteoblásticas humanas de osteossarcoma Saos-2 para avaliar e comparar a adesão inicial e comportamento subsequente dessas células em discos de TiCP e HA. As células foram plaqueadas nos discos e mantidas em cultura por períodos de 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas. Com base nos seus resultados, os autores observaram

que a HA inibiu a migração das células osteoblásticas. Pensou-se que a ocorrência mais cedo de osteogênese na HA seria causada pela presença de íons Ca no substrato, contudo os resultados obtidos pelos autores demonstraram que as células osteoblásticas na HA podem se diferenciar mais cedo do que no Ti ou vidro por uma alta afinidade para a adesão celular e determinação no substrato.

Ramires et al (2001) avaliaram a bioatividade e biocompatibilidade das coberturas TiO₂/HA preparadas em diferentes proporções (1:1, 2:1, 1:2). Pedacos de titânio de 20x10mm foram utilizados como substrato para as coberturas. Células osteoblásticas da linhagem MG63, originalmente de osteossarcoma humano foram cultivadas sobre as superfícies testadas. Como resultados, os autores observaram que esses materiais não são citotóxicos e permitiram a diferenciação celular, estimularam a expressão de alguns marcadores bioquímicos peculiares dos osteoblastos (atividade de fosfatase alcalina, produção de colágeno e osteocalcina). Em particular a cobertura TiO₂/HA 1 pareceu estimular mais que as outras amostras o aumento de alguns marcadores de diferenciação do fenótipo osteoblástico.

Lavos-Valereto et al (2002) utilizaram em seu experimento 24 discos de 12 mm de diâmetro por 2 mm de espessura de uma liga de titânio, a titânio-6 alumínio-7nióbio (Ti-6Al-7Nb). O Ti-6Al-7Nb é uma liga que mostra melhores propriedades mecânicas do que o titânio puro. Os autores decidiram analisar a proliferação e viabilidade celular de células osteoblásticas (osteo-1) nas amostras preparadas com e sem cobertura de HA. As células foram plaqueadas e contadas nos períodos de 3, 7, 11 e 15 dias de cultura. De acordo com os resultados obtidos, os autores puderam concluir que a presença da HA na superfície do Ti-6Al-7Nb prejudicou o crescimento e a viabilidade celular das células osteo-1. Além disso, a viabilidade celular e os estudos estruturais realizados pelos autores mostraram que o Ti-6Al-7Nb com e sem cobertura de HA tem propriedades física e biologicamente relevantes como um material para implantes.

Em seu estudo, Linez-Bataillon et al (2002) procuraram evidenciar o papel que a rugosidade de superfície de um biomaterial desempenha na proliferação celular, morfologia e expressão das diferentes proteínas de adesão. Os autores utilizaram como amostras do biomaterial discos de Ti-6Al-

4V com 15 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, divididos em cinco grupos de 30 discos: (i) jateados com partículas de 500 μm de alumínio (Al_2O_3), (ii-iv) superfícies polidas com papel carbide de silício nas gradações 80, 1200 e 4000, respectivamente, e (v) polimento com partículas de diamante com 0,25 μm . As células plaqueadas nas superfícies foram osteoblastos derivados da calvária de ratos em linhagem celular imortalizada (MC3T3-E1) e foram mantidas em cultura por 3 dias. De acordo com seus resultados, os autores puderam concluir que existe uma correlação significativa entre a rugosidade do material e a taxa de proliferação celular e, por outro lado, uma relação qualitativa entre rugosidade e adesão celular. Afirmam ainda que de fato, nas superfícies muito lisas, um aumento do crescimento celular está diretamente relacionado a um decréscimo da adesão celular.

Xavier (2002) avaliou a biocompatibilidade do Ti com diferentes tratamentos de superfície através da cultura de osteoblastos. O autor usou discos de Ti com superfícies usinadas, usinadas + ataque com ácido nítrico (HNO_3), usinadas + jateamento com alumínio (Al_2O_3) e usinagem + ataque ácido (HNO_3) + jateamento com Al_2O_3 . De acordo com, os resultados obtidos, o autor afirmou que tanto a adesão após 4 e 24 hs como a proliferação celular após 7, 14 e 21 dias não foram afetadas pelos tratamentos de superfície. A quantidade de proteína total avaliada na superfície com o tratamento de usinagem + ataque ácido + jateamento foi menor do que nas outras superfícies após 14 e 21 dias de cultura. Não houve diferença entre as superfícies na atividade de fosfatase alcalina nos períodos de 14 e 21 dias. A formação de matriz mineralizada após 21 dias de cultura foi menor sobre as superfícies usinadas + jateadas com alumínio e usinadas + ataque ácido + jateamento. Estes resultados sugerem que estes tratamentos de superfície com jateamento ou a combinação do jateamento e ataque ácido interferem negativamente com a biocompatibilidade do Ti.

Na tentativa de avaliar o papel biológico desempenhado pelas propriedades da superfície dos implantes de titânio na resposta óssea, Postiglione et al (2003) investigaram a proliferação celular, diferenciação e apoptose de células osteoblásticas humanas SaOS-2 cultivadas em discos de titânio com 1 cm de diâmetro e 1 mm de espessura com 3 diferentes superfícies (lisa, jateada e plasma-spray de titânio). Os resultados obtidos com

o seu trabalho mostram que existe uma correlação entre proliferação celular e diferenciação nas 3 superfícies de titânio investigadas. Na verdade, as células SaOS-2 proliferaram melhor nas superfícies lisas, enquanto superfícies rugosas promovem sua diferenciação em relação ao fenótipo osteoblástico. As análises dos dados do estudo sugerem que as superfícies rugosas podem favorecer um melhor resultado de implantes dentais *in vivo*, uma vez que eles parecem induzir diferenciação para o fenótipo osteoblástico, aumentando a regeneração óssea e a manutenção de uma osseointegração em longo prazo.

Kim et al (2003) analisaram em implantes (3,75 mm x 8,0 mm) de superfície tratada com jateamento e oxidação termal as características da superfície e a resposta óssea ao redor desses implantes através de análise histomorfométrica. Os implantes do grupo 1 foram jateados com óxido de alumínio (Al_2O_3) e os do grupo 2 jateados com o óxido de alumínio e termalmente oxidados a 800°C por 2 horas em uma atmosfera de oxigênio puro. Esses implantes foram instalados em 12 coelhos brancos New Zealand e após 4 semanas, a porcentagem de contato osso-implante dos implantes oxidados foi maior que dos implantes jateados. No entanto, segundo os autores, as porcentagens de contato osso-implante após 12 semanas não foram significativamente diferentes ($P > 0,05$) entre os dois grupos bem como a área óssea entre os tratados após 4 e 12 semanas entre os dois grupos.

Os autores Bächle e Kohal (2004) em sua revisão sistemática tentaram identificar todos os estudos *in vitro* que descrevem interações entre as células osteoblásticas MG63 com diferentes superfícies de implantes de titânio, relativos a proliferação, diferenciação e síntese de proteínas. A pesquisa dos artigos foi restrita pelos autores aos idiomas inglês e alemão, realizada no PubMed, ISI Web Science, Cochrane Library e International Poster Journal como bases de dados na língua inglesa e nos periódicos não indexados no Medline em alemão: Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie e Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift. Concluíram que as superfícies e condições de cultura variam bastante. Dessa forma, ainda é difícil recomendar uma superfície em particular. Segundo os autores, parece que não há diferenças na proliferação celular e diferenciação entre as superfícies tratadas por jateamento e ataque ácido.

Em seu estudo, Buser et al (2004) examinaram a aposição óssea em uma superfície SLA modificada (modSLA) na maxila de porcos miniaturas, comparando-as a superfícies SLA. Os implantes teste e controle possuem a mesma superfície, mas são potencialmente diferentes na química das mesmas. A superfície teste foi, segundo os autores, criada através do enxágüe da superfície sob proteção do gás nitrogênio (N₂) e armazenada em uma solução de cloreto de sódio (NaCl) isotônico. Foram instalados 3 ou 4 implantes por área desdentadas dos porcos miniaturas e os animais sacrificados após 2, 4 e 8 semanas. Os implantes teste demonstraram uma porcentagem média significativamente maior de contato osso-implante quando comparada com os controles em 2 e 4 semanas. Puderam assim, os autores, concluir que a superfície modSLA promove uma aposição óssea aumentada durante os estágios iniciais da regeneração óssea.

Jayaraman et al (2004) realizaram estudo onde células osteoblásticas obtidas do metacarpo de bezerros foram cultivadas sobre implantes com superfícies SLA e grooved (com ranhuras). As células foram mantidas em cultura por um período de 1 a 7 dias. De acordo com os resultados obtidos, os autores puderam afirmar que foi indicativo o fato de que a superfície experimental grooved apresenta uma melhor afinidade para fixação celular com uma rica expressão de proteínas da matriz extracelular (ECM) quando comparada à superfície rugosa SLA.

No estudo realizado por Szmukler-Moncler, Testori e Bernard (2004), os autores comparam a topografia de superfície tratada com ácido de quatro sistemas diferentes de implantes e checaram a reprodutibilidade do processo industrial de cada sistema de implante. Três implantes por sistemas foram selecionados de diferentes grupos e foram observados em microscopia eletrônica de varredura. A análise mostrou que cada sistema possui uma topografia de superfície diferente e nos casos de superfícies SLA, a rugosidade e a quantidade de partículas remanescentes do jateamento variou dentro dos próprios grupos. Baseados nos dados de avaliação biológica e clínica, os autores sugeriram que é o osso engrenado na interface que mantém as propriedades biológicas das superfícies texturizadas, bem mais que a forte fixação do implante.

Discos de titânio com área de 2 cm² e espessura de 1 mm possuindo superfícies TPS e SLA foram usados como amostras no estudo de Galli et al (2005), no qual os autores plaquearam osteoblastos humanos obtidos de espécimes de osso resultantes de procedimento cirúrgico na mandíbula de um paciente com 5 anos de idade. Os osteoblastos foram cultivados por 3, 6, 24 e 48 horas, quando procederam ao teste de adesão e a contagem da proliferação ocorreu após 7, 14 e 21 dias. Os autores puderam concluir, com base nos resultados obtidos, que embora as células tenham crescido em ambas as superfícies exibindo boa capacidade de adesão, fenótipo osteoblástico bem diferenciado e com um potencial de proliferação mantido, o estudo sugeriu que o TPS oferece um melhor desempenho do que o SLA por criar, pelo menos nas fases iniciais, melhores condições para a regeneração dos tecidos.

Sader et al (2005) realizaram estudo investigativo do comportamento do osteoblasto através da encubação de células dos fêmures de rato Balb/c em superfícies lisas e rugosas do titânio. O foco maior foi no efeito da rugosidade na adesão, viabilidade e diferenciação, mas também objetivaram avaliar a influência das partículas residuais da alumina no comportamento celular. Utilizou-se no estudo um total de 96 amostras divididas em três grupos: (i) Ti-Polido, polido com uma ponta de silicone de abrasividade 600; (ii) Ti-Jateado, jateado com alumina; e (iii) Ti-Jateado-ataque ácido, jateado com alumina e submetido a um duplo ataque ácido com ácido fluorídrico (4%) e peróxido de hidrogênio (8%). Os autores plaquearam 5×10^4 células/cm² nas amostras que foram incubadas por 2, 4, 24 e 48h e observaram que os osteoblastos aderiram e se espalharam nas três superfícies testadas. Os osteoblastos são capazes de proliferar e diferenciar nos três substratos avaliados. O número de células alcançou valores semelhantes em todas as amostras testadas a longo prazo nas culturas e as partículas de alumina não afetaram o comportamento dos osteoblastos.

Em estudo realizado por Sammons et al (2005), os autores utilizaram 7 implantes comercialmente disponíveis de quatro fabricantes diferentes com superfícies titânio plasma-spray, jateado e/ou ataque ácido, anodizado e liso (como maquinado). Na primeira parte do estudo, o espalhamento celular em um período de 30 minutos foi analisado através da MEV e, na segunda parte, os implantes foram levados à cultura nas bolsas de nylon em contato com

fragmentos ósseos para comparar a migração celular nos mesmos implantes. Segundo os autores, o estudo demonstrou que em comparação com as outras superfícies de implantes comerciais testados, as superfícies microporosas da FRIADENT[®] plus e as superfícies SLA[®] aumentaram o espalhamento de osteoblastos primários da calvária de ratos durante um período de 30 min de adesão. O espalhamento celular, morfologia e alinhamento foram influenciados pelas microestruturas nas suspensões e culturas nas bolsas de nylon. Os resultados posteriores sugerem que a cultura em bolsas de nylon é um meio útil de comparação do comportamento celular em implantes comerciais dentro de um meio ambiente ósseo tri-dimensional simulando um local de instalação de implantes e provê informação complementar à obtida pelos estudos de adesão celular.

Germanier et al (2006) realizaram estudo onde investigaram taxa de aposição óssea em uma superfície SLA coberta com um polímero peptídeo-RGD (Arg-Gly-Asp)-modificado na maxila de porcos miniaturas e comparado com uma superfície SLA comum. As amostras teste e controle possuem a mesma topografia de superfície, mas diferem nas suas coberturas de polímeros. A hipótese levantada pelos autores seria a de que uma superfície SLA coberta com RGD poderia promover a adesão específica para células de origem mesenquimal, como os osteoblastos, e por sua vez, promover uma aposição óssea mais rápida em comparação com a superfície SLA convencional. Os implantes foram instalados na maxila dos porcos e a formação óssea em volta deles analisada após 2 e 4 semanas de reparação. Os autores obtiveram como resultados que após 2 semanas, os implantes com a cobertura RGD demonstraram percentagens significativamente maiores de contato osso-implante quando comparados com os controles. Concluíram que as coberturas estudadas podem promover um aumento na aposição óssea durante os estágios primários da regeneração óssea.

O estudo de Shalabi et al (2006) compreendeu uma análise sistemática dos dados relativos à rugosidade da superfície de implantes para determinar, se houver, sua relação com a regeneração óssea e testes biomecânicos. As hipóteses levantadas pelos autores em seu estudo foram que (1) maior rugosidade de superfície leva a um maior contato osso-implante (BIC); e que (2) uma maior rugosidade de superfície do implante resulta em um maior torque

de resistência. A pesquisa foi realizada na base de dados eletrônica MEDLINE com artigos publicados entre 1953 e 2003, tendo como a palavra chave “implantes dentais”. Apenas os artigos em inglês foram selecionados e dois leitores independentes realizaram a seleção das referências encontradas de acordo com os critérios da pesquisa. Os autores puderam concluir que o número de artigos que se encaixaram nos critérios foi muito limitado. Não obstante, a análise estatística dos dados disponíveis forneceu evidências encorajadoras para uma possível relação entre BIC e rugosidade de superfície.

Em pesquisa realizada por Campos (2007) para analisar as características físicas, químicas e biológicas de dois tipos de superfícies de implantes osseointegráveis, o autor utilizou 58 discos de liga de titânio (29 maquinados e 29 tratados com ataque ácido) com 3 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Os corpos de prova foram analisados com MEV, perfilômetro de contato, espectroscopia de energia dispersiva (EDS), goniômetro e cultura de células do estroma da medula óssea. A contagem de células aderidas realizada pelo autor não mostrou diferença significativa entre as superfícies após 18 horas (teste de Mann Whitney / $p < 0,05$) e concluiu que modificações na rugosidade superficial dos implantes de titânio podem promover significantes diferenças na morfologia das células estromais. Entretanto, neste micro ambiente não foi notada diferença no fenômeno da adesão.

Em seu artigo, Chiesa et al (2007) evidenciam os resultados da caracterização *in vivo* e *in vitro* de um novo tratamento biomimético da superfície de implantes de titânio através da anodização e deposição anódica de partículas (ASD) com ânions de fosfato e cátions de cálcio, desenvolvido para aumentar a osseointegração. Os testes *in vitro* confirmaram o potencial biomimético do novo tratamento proposto. A análise histomorfométrica indicou o potencial para uma osseointegração rápida e de boa qualidade. Os resultados *in vitro* e *in vivo* indicaram que o novo tratamento proposto possui um potencial significativo para aumentar a taxa de osseointegração do titânio para implantes dentais endósseos.

Qu et al (2007) tentaram avaliar a influência de espécimes de titânio hidrofílicas versus hidrofóbicas com diferentes topografias e níveis de rugosidade na orientação e proliferação celular com fotografias aceleradas e também avaliar pela transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase

(RT-PCR) a expressão de genes envolvidos na reparação e osteogênese. As amostras foram discos de 15 mm de diâmetro e 1 mm de espessura com superfícies tratadas com ataque ácido (A), ataque ácido modificado (modA), jateada mais ataque ácido (SLA) e jateada mais ataque ácido modificada (modSLA). As células utilizadas foram as osteoblásticas de linhagem originalmente isolada de osteossarcoma humano (MG63), as quais foram plaqueadas nas superfícies testadas e mantidas em cultura durante 2 dias. Os autores, baseados em seus resultados, afirmam que ficou demonstrado que a superfície modSLA resulta em um aumento da formação de agrupamentos de osteoblastos crescendo na superfície e em um aumento da expressão dos genes reguladores da osteogênese nos osteoblastos.

Ponader et al (2008) afirmaram que a adesão inicial das células é o principal responsável pelo sucesso posterior da osseointegração. Em seu estudo, os autores focaram na influência de espécimes produzidos pelo processo de fusão em forno por feixe de elétrons (Electron Beam Melting - EBM)² do pó do Ti-6AL-4V com diferentes topografias e porosidades na adesão inicial da célula, proliferação e diferenciação celular, bem como na morfologia das células. As células foram plaqueadas em 5 discos (dois de superfície lisa e três com superfícies tratadas) nos períodos de 1, 3, 7 e 14 dias. De acordo com os autores, os resultados do seu estudo demonstram que os osteoblastos humanos são capazes de aderir, proliferar e diferenciar em espécimes de Ti-6AL-4V fabricados pelo processo de fusão em forno por feixe de elétrons. Os genes da proliferação e diferenciação osteogênica podem ser expressados dentro de poucos dias dos osteoblastos semeados em matrizes processadas por EBM. Os osteoblastos podem entrar em estágio de proliferação em superfícies lisas ou rugosas-texturizadas se o valor da média da rugosidade da superfície (R_a) não exceder 24,9 μm e a mesma superfície pode, ainda, promover a diferenciação dos osteoblastos.

² Neste processo, a fusão ocorre em um cadinho de cobre refrigerado a água eliminando-se a contaminação por carbono. Como se trabalha em um vácuo da ordem de 10^{-2} Pa, torna-se mínima a contaminação por oxigênio. (CRUZ et al, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINGOTE DA LIGA NITI COM EFEITO DE MEMÓRIA DE FORMA. In: Encontro de Iniciação Científica e Pós-Graduação do ITA, 10, 2004, São Jose dos Campos, **Artigos...** Disponível em www.bibl.ita.br/xencita/Artigos/59.pdf. Acesso em 07/09/2008.)

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho se propôs a analisar o desempenho de três diferentes tipos de superfície de implantes dentais (jateamento seguido por duplo ataque ácido, jateamento seguido por ataque ácido e duplo ataque ácido) frente a células osteoblásticas em cultura celular por meio dos testes de adesão e de proliferação celular sob microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Realizamos a cultura celular e a análise em microscopia de luz do presente trabalho no Laboratório de Patologia da Universidade São Leopoldo Mandic, Campinas/SP. A análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Instituto de Biologia da Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas/SP.

4.1 IMPLANTES DENTAIS

Foram utilizadas no estudo três diferentes marcas comerciais de implantes usados em Odontologia: BTLock³, SIN⁴ e Titanium Fix⁵. Todas as marcas possuem superfícies tratadas e com diferentes formas de tratamento. A BTLock possui um tratamento de jateamento com duplo ataque ácido, a Titanium Fix com jateamento e ataque ácido e a SIN com duplo ataque ácido (Tabela 01 e Figura 01).

Tabela 01 – Apresentação dos dados correspondentes às amostras utilizadas

MARCA	SUPERFÍCIE	DIMENSÕES	AMOSTRAS
BTLock	Jateamento e duplo ataque ácido	5,5 mm x 8,0 mm	09
SIN	Duplo ataque ácido	5,0 mm x 8,5 mm	09
Titanium-Fix	Jateamento e ataque ácido	5,0 mm x 8,5 mm	09
Lamínulas	Superfície lisa de vidro	Ø 13 mm	12

³ BTLock S.r.l, Vicenza, Itália

⁴ SIN – Sistema de Implante, São Paulo, Brasil

⁵ Titanium Fix, A.S Technology, São José dos Campos, Brasil

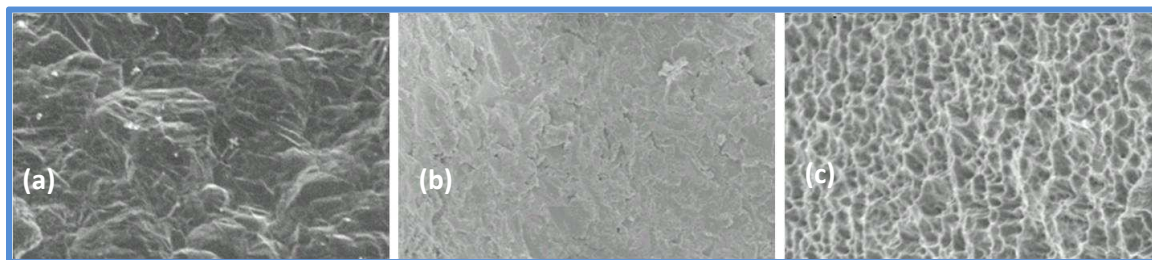


Figura 01 – Micrografia das superfícies dos implantes: (a) jateamento com duplo ataque ácido (BTLock); (b) jateamento com ataque ácido (Titanium Fix); (c) duplo ataque ácido (SIN) (aumento de 1000x).

De cada marca de implantes foram usadas 09 (nove) amostras, perfazendo um total de 27 implantes. Como controle, utilizou-se lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro. Às lamínulas e aos implantes, foram atribuídos números (1 a 12 e 1 a 27, respectivamente), de modo que, durante todo o desenvolvimento do estudo, não se soubesse qual marca e superfície estava sendo analisada. A quantidade das amostras teste e do controle para os testes realizados estão apresentados na Tabela 02.

Tabela 02 – Distribuição do número de amostras com relação aos testes realizados

AMOSTRAS	ADESÃO	PROLIFERAÇÃO			MEV		
		24 h	72 h	7 d	24 h	72 h	7 d
BTLock	06	02	02	02	01	01	01
SIN	06	02	02	02	01	01	01
Titanium-Fix	06	02	02	02	01	01	01
Lamínulas	09	03	03	03	01	01	01

4.2 CULTURA CELULAR

A metodologia seguida para o trabalho com as células se baseou, com algumas modificações e adaptações, na utilizada por Chiesa et al (2007) em seu estudo *in vitro* com células osteoblásticas de osteossarcoma da linhagem

MG63. Em nosso estudo, células osteoblásticas de osteossarcoma humanas pertencentes à linhagem SJS-1 (ATCC[®], Manassas, VA, EUA) foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute - RPMI (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com soro fetal bovino em uma concentração final de 10% mais solução de antibiótico e antimicótico (Pen/Strep/Fungizone) 10.000 U/mL Penicilina G, 10.000 µg/mL Estreptomicina, 25 µg/mL, Anfotericina B (HyClone, Logan, UT, EUA) . Essas células foram mantidas em incubação (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EUA) a 37°C e 5% de CO₂ para o seu crescimento. Após uma semana, com as células em subconfluência, as mesmas foram destacadas do frasco de cultura (Figura 02) por meio da solução de tripsina/EDTA 2,5g/L (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). A solução de tripsina foi, em seguida, inativada com o RPMI para que a mesma não provocasse a morte celular. O meio com as células em suspensão foi centrifugado (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburgo, Alemanha) e o sobrenadante descartado. Em seguida, as células foram levadas à câmara de Neubauer evidenciadas com solução de Trypan Blue 0,4% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e, após contagem em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100, Tokyo, Japão), o número de células da solução inicial foi de 1056×10^4 células/mL.

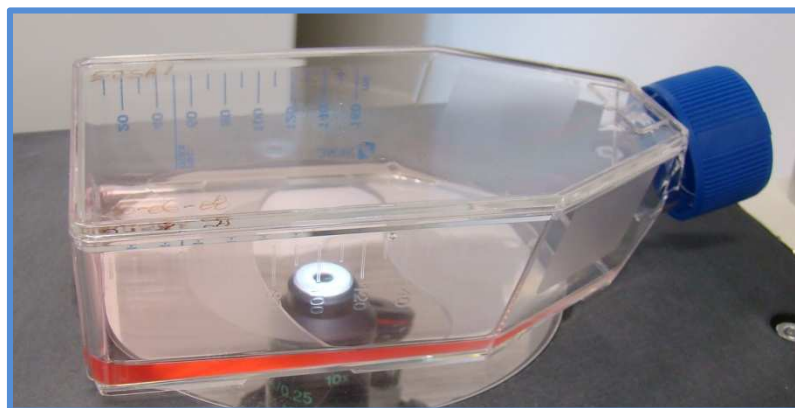


Figura 02 – Frasco de cultura celular.

Os implantes foram estabilizados em suportes plásticos em placas multi-wells de seis poços, onde as lamínulas também foram mantidas. Sobre as amostras, foi gotejado 12,5 µL da solução inicial (quantidade obtida por observação no estudo piloto), pois essa foi a quantidade suficiente para cobrir a

área desejada, tanto na lamínula quanto no implante, sem que a mesma pudesse escorrer ou extravasar (Figura 03). A quantidade de células no meio gotejado nos implantes e lamínulas foi de $13,2 \times 10^4$ células. As placas foram levadas para a incubação à 37°C por um período de 2 horas para que houvesse a adesão inicial das células.

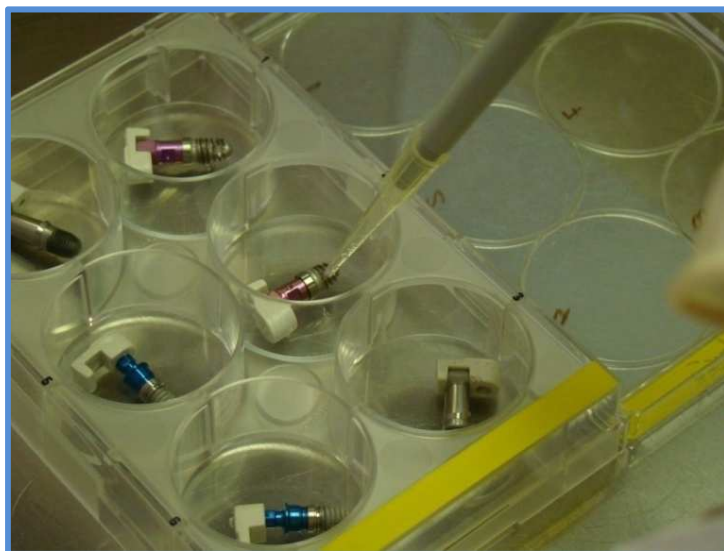


Figura 03 - Implantes já estabilizados na placa de seis poços e as células sendo plaqueadas

4.3 ADESÃO CELULAR

Após 2 horas com as células gotejadas sobre os implantes e lamínulas na incubação, os poços da placa foram completamente cheios com o RPMI e, logo em seguida, o meio foi pipetado e armazenado em tubos para a contagem. Novamente os poços foram completados com o RPMI e as placas levadas de volta para a incubação a fim de atingirem os tempos de contagem da proliferação celular.

Para a contagem, agitou-se antes o meio com as células, de forma que ficasse mais homogêneo. Coletou-se 10 μL do meio com as células, o mesmo foi misturado com a solução de Trypan Blue e levado à câmara de Neubauer (Figura 04 e 05). Foram contadas as células presentes em apenas um dos quadrantes da câmara e a contagem foi realizada por dois

observadores diferentes. Os números obtidos com a contagem dos quadrantes são aplicados em uma fórmula baseada no volume da câmara e num fator de diluição para se chegar ao número das células presentes na solução.

Os dados obtidos através da câmara de Neubauer foram analisados estatisticamente através dos testes de Análise de Variância (ANOVA) utilizada para comparar mais de dois grupos e o Teste t, que realiza comparação entre dois grupos apenas. Haverá diferença significativa sempre que o *valor-P* for igual ou inferior ao nível de significância de 0,05, caso contrário não haverá diferença significativa.

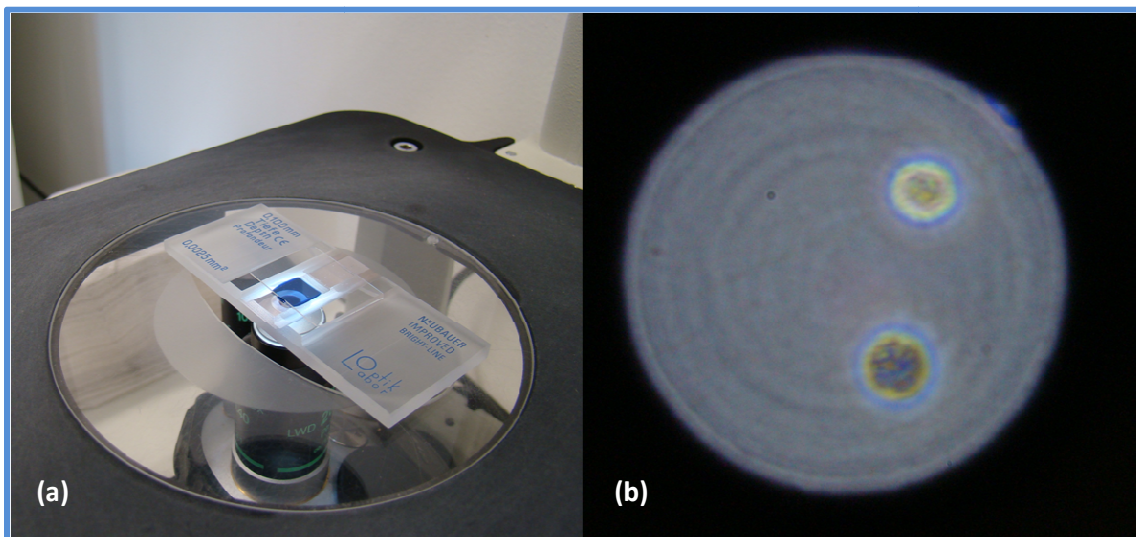


Figura 04 – Imagem da câmara de Neubauer (a) em microscópio invertido onde se observam células viáveis (citoplasma claro) e inviáveis (citoplasma escuro) (b).

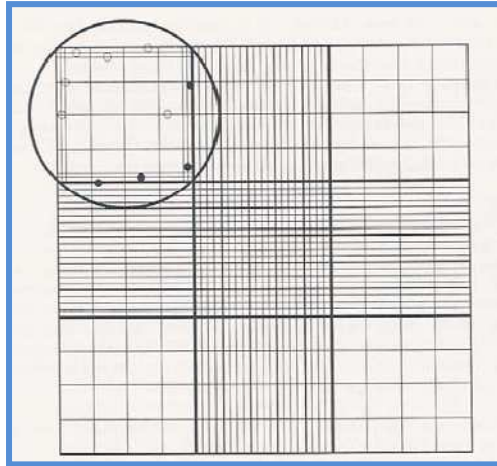


Figura 05 – Representação esquemática da câmara de Neubauer vista ao microscópio. Conta-se as células que se apresentam nos quadrantes iguais ao destacado na figura (Imagem obtida na internet no endereço www.icb.usp.br/~bmm/materiais/P3a%20%20Contagem%20de%20celulas%20em%20camara%20de%20Neubauer.pdf).

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

De cada grupo de implantes e lamínulas, uma amostra foi retirada para a observação em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Cada grupo compreendeu um tempo diferente de incubação e proliferação celular: 24 horas, 72 horas e 7 dias.

Após atingirem os tempos desejados, todas as amostras foram submetidas ao mesmo tratamento para a MEV. O meio foi retirado, os implantes e lamínulas lavados com o PBS (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e imersos no fixador Karnovsky (glutaraldeído 1% e paraformaldeído 1% em tampão cacodilato) durante 3 horas. Na pós-fixação, três lavagens de cinco minutos cada uma em imersão no tampão cacodilato 0,1M e duas horas no tetróxido de ósmio 1%, seguida de mais três lavagens de cinco minutos com o tampão cacodilato 0,1M. Seguiu-se com a desidratação em etanol, em dois banhos de imersão de cinco minutos cada um, iniciando no etanol 30, passando para o etanol 50, 70, 80, 90 e 100, finalizando com a secagem das

amostras no ponto crítico (Balzers CPD-030 Critical Point Dryer; Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein) (Figura 06).

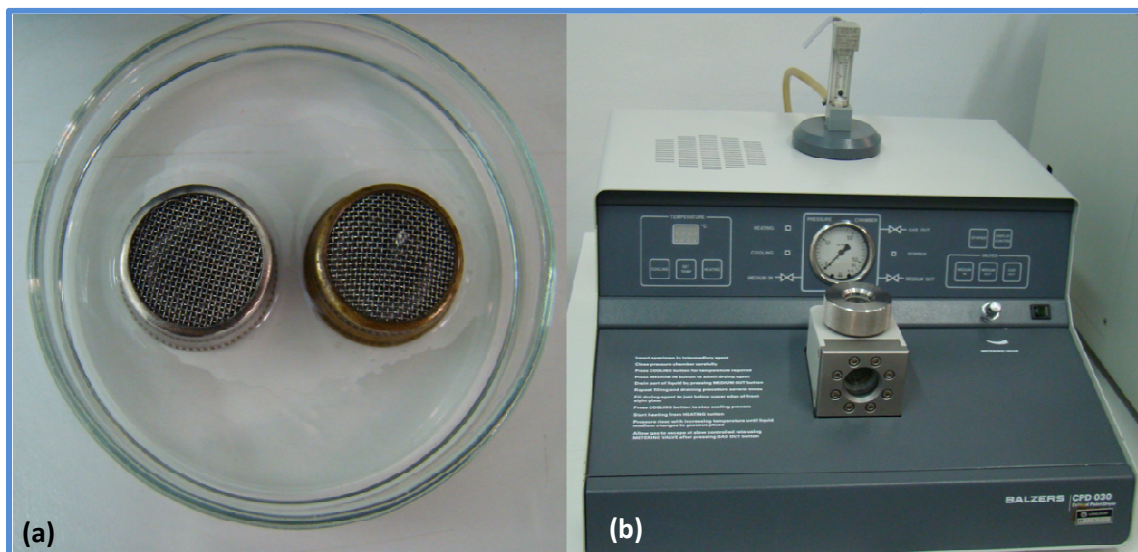


Figura 06 – (a) Amostras preparadas para a secagem; (b) Ponto crítico

Com as amostras devidamente desidratadas, seguiu-se com o sputter (Balzers SCD 050 Sputter Coater, Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein), que se trata da deposição de uma fina camada de filme metálico de alta pureza (ouro) na superfície das amostras, para que as mesmas pudessem ser analisadas no microscópio eletrônico (JEOL JSM 5800LV, JEOL Ltd., Tokyo, Japão). Os implantes foram divididos em 3 terços: cervical, médio e apical (Figura 07). De cada uma das áreas, foram obtidas uma imagem das células em aumentos de 300X, 1000X e 5000X para que pudessem ser observados o número e a morfologia celular.

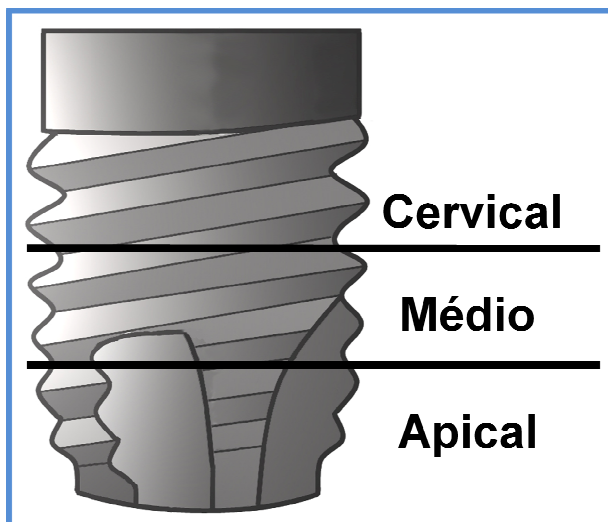


Figura 07 – Representação esquemática da divisão dos implantes com \varnothing 5.0 em 3 terços: cervical, médio e apical

4.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Nos testes de proliferação celular, os implantes e as lamínulas foram submetidas à ação da tripsina/EDTA para que as células fossem soltas de sua superfície. Logo em seguida, a tripsina foi inativada por ação do RPMI para que a mesma não causasse lise celular. A partir daí se obteve uma suspensão celular de cada amostra tripsinizada que foi armazenada em tubos eppendorf (figura 08).



Figura 08 – Tubo eppendorf com implante ainda imerso na suspensão celular.

Da suspensão, 10 μ L foram misturados com 10 μ L do Trypan Blue para a evidenciação das células. A mistura suspensão/Trypan Blue foi levada ao microscópio invertido e as células visualizadas, contadas por dois observadores diferentes. A partir desses dados, os números da proliferação celular foram obtidos e os dados analisados estatisticamente através do teste de Análise de Variância (ANOVA). Neste estudo, 4 grupos em cada período de coleta de dados foi comparado, optando-se, assim, pelo uso do teste ANOVA.

Seguindo metodologia estabelecida por Lumbikanonda e Sammons (2001), a análise da proliferação celular também foi realizada através das imagens obtidas pela MEV. Os implantes não apresentaram uma distribuição celular uniforme em toda a superfície, optando-se por realizar a contagem através de uma amostragem, levando em consideração as três áreas em que foi dividido o implante (terços apical, médio e cervical). As células presentes nas imagens com aumento de 300X obtidas de cada uma das áreas dos implantes foram contadas, considerando apenas aquelas que se apresentavam bem identificadas e as que estavam inteiramente no campo fotografado. No caso das aglomerações celulares, contou-se individualmente as células que apresentavam seu contorno completamente evidente e nas que não foi possível diferenciar as células individualmente, o aglomerado foi contado como uma única célula. Os resultados da contagem foram compilados e avaliados estatisticamente.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ADESÃO CELULAR

Os resultados da adesão celular, obtidos através de contagem celular na câmara de Neubauer são mostrados nas Tabelas 03 e 04. Tais dados obtidos foram submetidos ao testes ANOVA e Teste t. No ANOVA, realizou-se comparação entre as células aderidas dos grupos (controle, BTLock, Titanium Fix e SIN). No Teste t, a comparação se restringiu a ser realizada dentro de cada grupo, entre o número de células plaqueadas e o número de células aderidas obtido pelo teste de adesão.

Tabela 03 – Resultado da contagem da adesão celular nos implantes por microscopia de luz.

IMPLANTES	PLAQUEADAS	ADERIDAS
BTLock	132000	112000
	132000	92000
	132000	112000
	132000	132000
	132000	92000
	132000	132000
TitaniumFix	132000	112000
	132000	132000
	132000	132000
	132000	112000
	132000	112000
	132000	112000
SIN	132000	132000
	132000	112000
	132000	112000
	132000	112000
	132000	132000
	132000	112000

Tabela 04 - Resultado da contagem da adesão celular nas lamínulas por microscopia de luz.

CONTROLE	PLAQUEADAS	ADERIDAS
1	132000	132000
2	132000	112000
3	132000	112000
5	132000	132000
6	132000	112000
7	132000	112000
9	132000	132000
10	132000	112000
11	132000	132000

Não existiu diferença significativa para $P < 0,05$ entre os grupos analisados e o grupo controle na adesão celular (Tabelas 05 e 06). Os resultados indicam que as células aderem sem diferenças entre a superfície do vidro (controle) e as superfícies tratadas do titânio (Figura 09).

Tabela 05 – Resumo da análise estatística ANOVA dos dados da microscopia de luz para a adesão celular dos grupos Controle, BTLock, TitaniumFix e SIN

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância	Desvio Padrão
ADERIDAS Controle	9	1088000	120888,8889	111111111,1	10540,92553
ADERIDAS BTLock	6	672000	112000	320000000	17888,54382
ADERIDAS TitaniumFix	6	712000	118666,6667	106666666,7	10327,95559
ADERIDAS SIN	6	712000	118666,6667	106666666,7	10327,95559

P = 0,597676763

Tabela 06 - Teste ANOVA dos dados obtidos da adesão celular por microscopia de luz para os grupos analisados

Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	296296296,3	3	98765432,1	0,638888889	0,597676763	3,027998384
Dentro dos grupos	3555555556	23	154589372			
Total	3851851852	26				

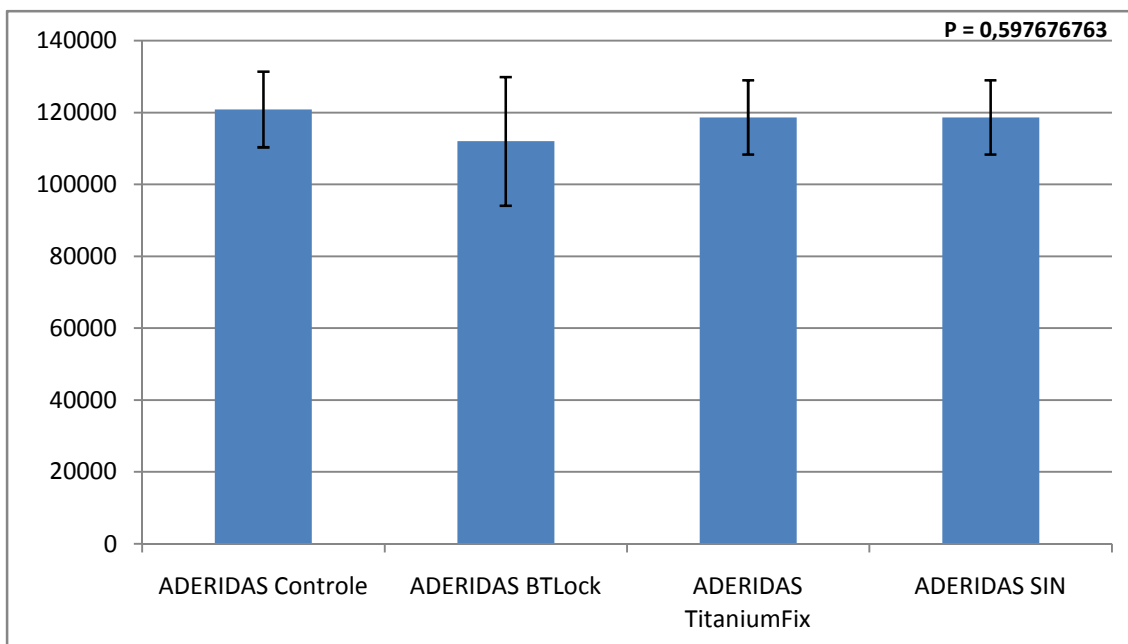


Figura 09 – Gráfico representando as médias da adesão celular nas superfícies controle e tratadas dos implantes de titânio.

O Teste t foi realizado dentro de cada grupo específico, ou seja, foram analisados estatisticamente os dados obtidos da adesão quando comparados ao número de células plaqueadas, que foi o mesmo para todas as amostras.

O grupo controle mostrou diferença significativa entre as células aderidas e plaqueadas, pois o valor $P(T \leq t)$ bi-caudal se apresentou menor que o nível de significância de 0,05 (Tabela 07 e Figura 10).

Tabela 07 - Teste-t para o grupo controle

	<i>PLAQUEADAS Controle</i>	<i>ADERIDAS Controle</i>
Média	132000	120888,8889
Variância	0	11111111,1
Desvio Padrão	0	10540,92553
Observações	9	9
$P(T \leq t)$ uni-caudal	0,006674532	
$P(T \leq t)$ bi-caudal	0,013349063	

Os grupos BTLock, TitaniumFix e SIN também apresentaram valor $P(T \leq t)$ bi-caudal menor que o nível de significância de 0,05, sendo, portanto,

significante a diferença entre células plaqueadas e aderidas para todos os grupos (Tabelas 08, 09 e 10; Figura 10).

Tabela 08 - Teste-t para o grupo BTLock

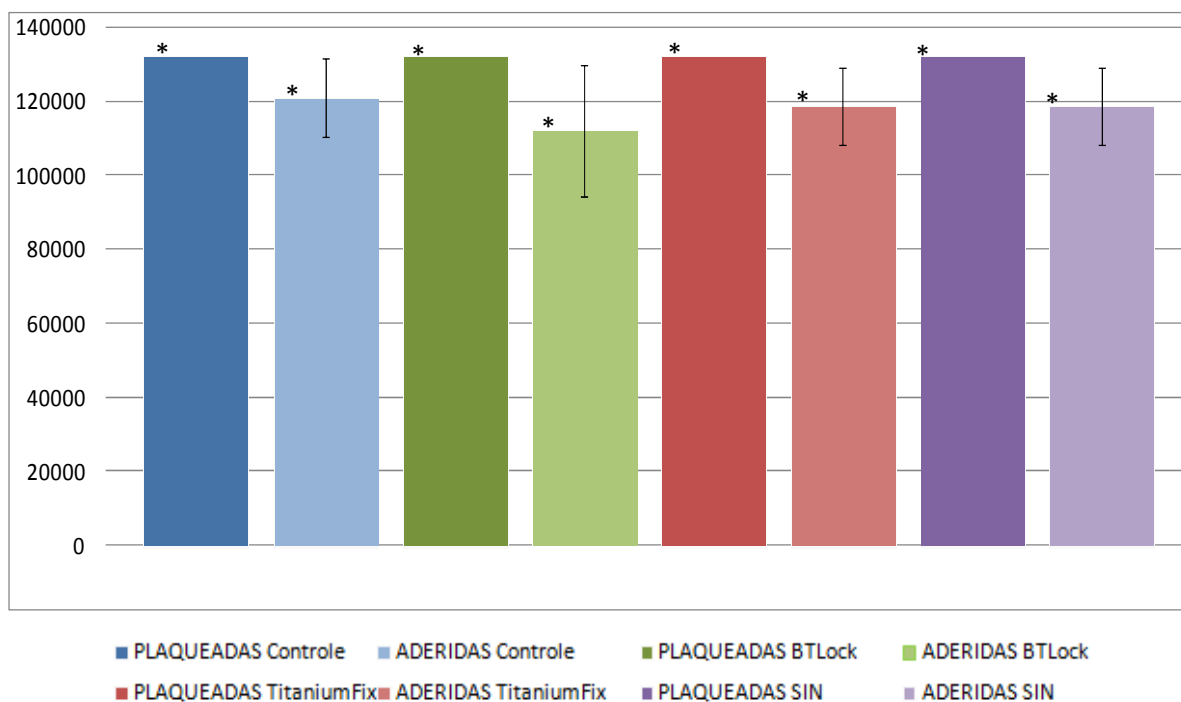
	<i>PLAQUEADAS BTLock</i>	<i>ADERIDAS BTLock</i>
Média	132000	112000
Variância	0	320000000
Desvio Padrão	0	17888,54382
Observações	6	6
P(T<=t) uni-caudal	0,020429702	
P(T<=t) bi-caudal	0,040859404	

Tabela 09 - Teste-t para o grupo TitaniumFix

	<i>PLAQUEADAS TitaniumFix</i>	<i>ADERIDAS TitaniumFix</i>
Média	132000	118666,6667
Variância	0	106666666,7
Desvio Padrão	0	10327,95559
Observações	6	6
P(T<=t) uni-caudal	0,012515508	
P(T<=t) bi-caudal	0,025031016	

Tabela 10 - Teste-t para o grupo SIN

	<i>PLAQUEADAS SIN</i>	<i>ADERIDAS SIN</i>
Média	132000	118666,6667
Variância	0	106666666,7
Desvio Padrão	0	10327,95559
Observações	6	6
P(T<=t) uni-caudal	0,012515508	
P(T<=t) bi-caudal	0,025031016	



* Significante para $P(T \leq t)$ bi-caudal $< 0,05$

Figura 10 – Gráfico representando a comparação entre as médias das células aderidas com relação às plaqueadas nos grupos controle, BTLock, Titanium Fix e SIN.

5.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR

5.2.1 MICROSCOPIA DE LUZ

Os dados da proliferação celular foram obtidos através da câmara de Neubauer e analisados através de ANOVA. Os testes de proliferação compreenderam a análise de períodos diferentes de crescimento celular, sendo eles 24 horas, 72 horas e 7 dias.

No período de 24 horas, os resultados indicaram diferença significativa entre os dados dos grupos analisados, já que o valor-P se mostrou menor que 0,05 (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11 – Resumo dos dados estatísticos da análise em microscopia de luz para a proliferação celular no período de 24h dos grupos Controle, BTLock, TitaniumFix e SIN

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>Desvio Padrão</i>
CONTROLE 24 h [■]	6	320000	53333,33	426666666,7	20655,91118
BTLOCK 24h [†] [▲] [*]	4	400000	100000	533333333,3	23094,01077
TitaniumFix 24 h [■]	4	160000	40000	2133333333	46188,02154
SIN 24h [■]	4	200000	50000	400000000	20000

Significante para P<0,05 P = 0,041784914

[†] Significante comparado com o controle; [■]Significante comparado com BTLock; [▲]Significante comparado com Titanium Fix; ^{*}Significante comparado com SIN

Tabela 12 - Teste ANOVA dos dados obtidos da proliferação celular por microscopia de luz para os grupos analisados no período de 24 horas

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>GI</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	8666666667	3	2,89E+09	3,568627451	0,041784914	3,343888681
Dentro dos grupos	11333333333	14	8,1E+08			
Total	20000000000	17				

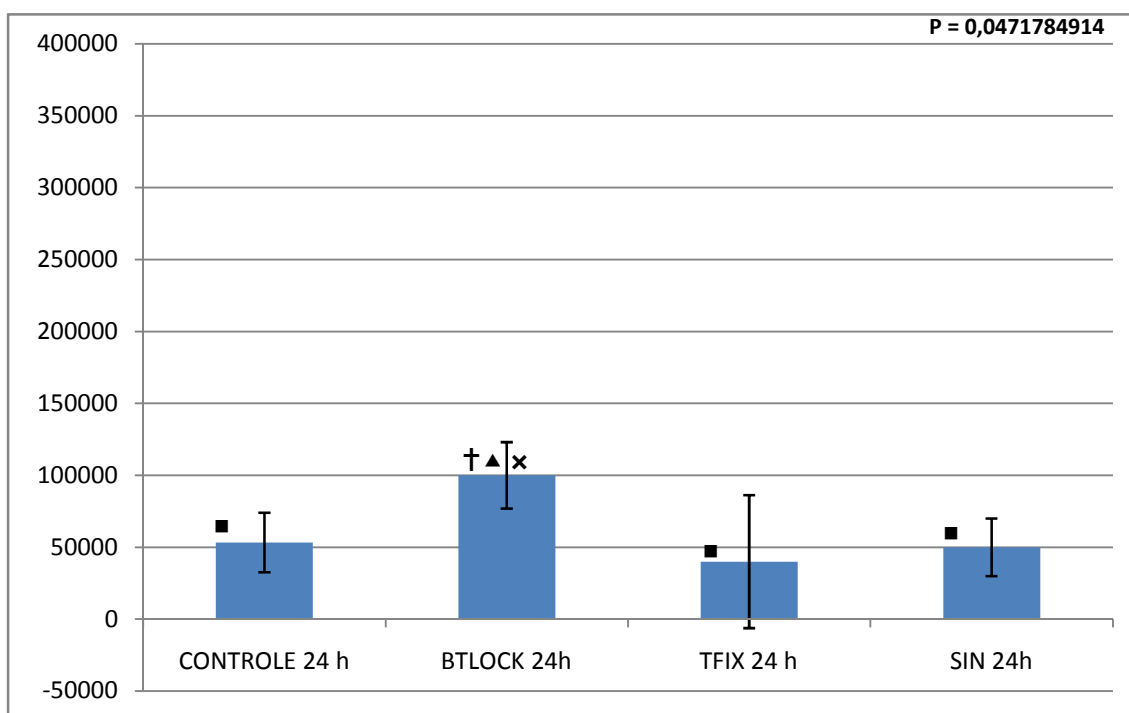
Realizou-se teste de Tukey-Kramer para verificar onde está a diferença significativa entre os grupos Controle, BTLock, TitaniumFix e SIN no período de 24 horas (Tabela 13).

Tabela 13 – Resultados do teste Tukey-Kramer para amostras avaliadas pela microscopia de luz no período de 24 horas de proliferação

<i>Dados Comparados</i>	<i>Análise</i>
CONTROLE 24 h e BTLOCK 24h	Existe diferença significativa
CONTROLE 24 h e TFIX 24 h	Não existe diferença significativa
CONTROLE 24 h e SIN 24h	Não existe diferença significativa
BTLOCK 24h e TFIX 24 h	Existe diferença significativa
BTLOCK 24h e SIN 24h	Existe diferença significativa
TFIX 24 h e SIN 24h	Não existe diferença significativa

O grupo BTLock se mostrou com uma média de proliferação superior ao grupo Controle no período de 24 horas de proliferação, enquanto o grupo Titanium Fix obteve uma média menor em relação ao grupo controle, e o grupo

SIN obteve médias bem próximas às do grupo controle, também no mesmo período (Figura 14).



Significante para $P < 0,05$ † Significante comparado com o controle; ■ Significante comparado com BTLock; ▲ Significante comparado com Titanium Fix; * Significante comparado com SIN

Figura 11 – Gráfico representando as médias dos valores de proliferação dos grupos, obtidos por microscopia de luz em 24 horas de proliferação.

No período de 72 horas, não houve diferença significativa entre os valores dos grupos analisados e o grupo controle para $P < 0,05$ (Tabelas 14 e 15).

Tabela 14 – Resumo dos dados estatísticos da análise em microscopia de luz para a proliferação celular no período de 72h dos grupos Controle, BTLock, TitaniumFix e SIN

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância	Desvio Padrão
CONTROLE 72h	6	960000	160000	34560000000	185903,2006
BTLOCK 72 h	4	80000	20000	533333333,3	23094,01077
TFIX 72h	4	160000	40000	2133333333	46188,02154
SIN 72h	4	480000	120000	8533333333	92376,04307

$P = 0,281163595$

Tabela 15 - Teste ANOVA dos dados obtidos da proliferação celular por microscopia de luz para os grupos analisados no período de 24 horas

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	62400000000	3	2,08E+10	1,410852713	0,281163595	3,343888681
Dentro dos grupos	206400000000	14	1,47E+10			
Total	2,688E+11	17				

No período das 72 horas, o grupo controle mostrou uma média dos valores de proliferação obtidos maior que a de todos os grupos teste (Figura 15).

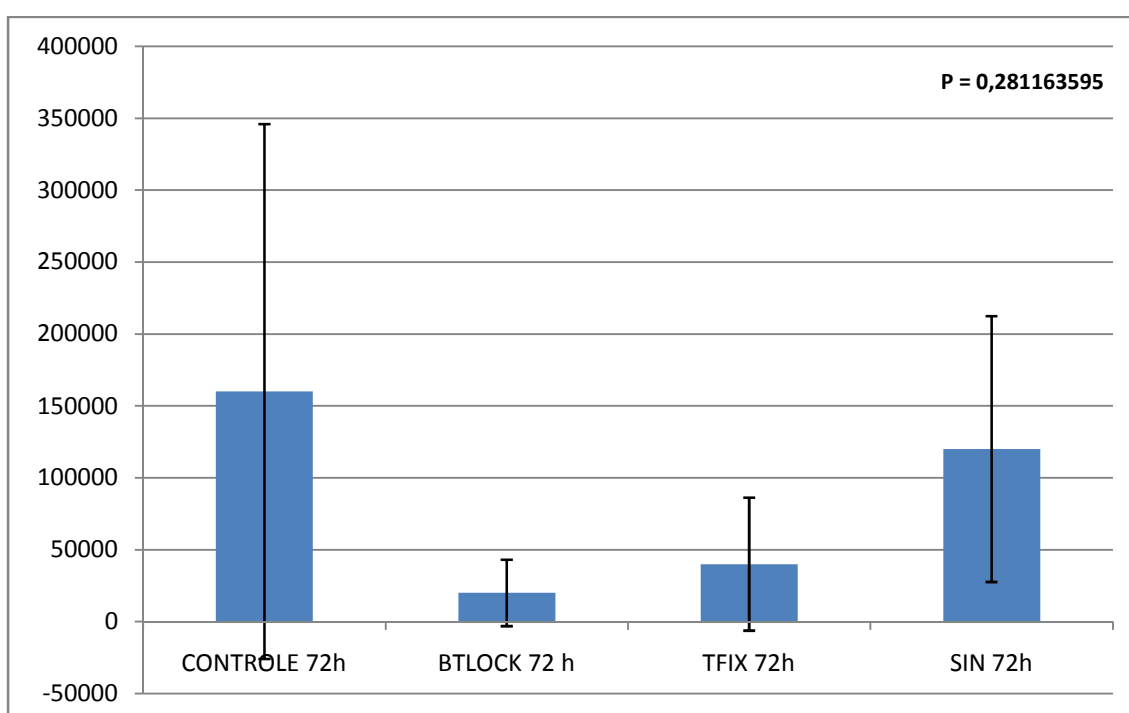


Figura 12 – Gráfico representando as médias dos valores de proliferação dos grupos, obtidos por microscopia de luz em 72 horas de proliferação.

O último período de proliferação analisado foi o de 7 dias. As amostras teste e o grupo controle foram mantidos em incubação durante esse período e os resultados obtidos, após a análise ANOVA, não mostraram diferença significativa entre os grupos (Tabelas 16 e 17).

Tabela 16 – Resumo dos dados estatísticos da análise em microscopia de luz para a proliferação celular no período de 7 dias dos grupos Controle, BTLock, TitaniumFix e SIN

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
CONTROLE 7 DIAS	6	960000	160000	0
BTLOCK 7 DIAS	4	160000	40000	0
TFIX 7 DIAS	4	0	0	0
SIN 7DIAS	4	80000	20000	533333333,3

P = 3,03047

Tabela 17 - Teste ANOVA dos dados obtidos da proliferação celular por microscopia de luz para os grupos analisados no período de 7 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	81600000000	3	2,72E+10	238	3,03047E-12	3,343888681
Dentro dos grupos	1600000000	14	1,14E+08			
Total	83200000000	17				

No período de 7 dias de proliferação, as médias do grupo controle se mantiveram mais altas que as dos grupos teste (Figura 16), mantendo-se consoante com os resultados já apresentados na Figura 15.

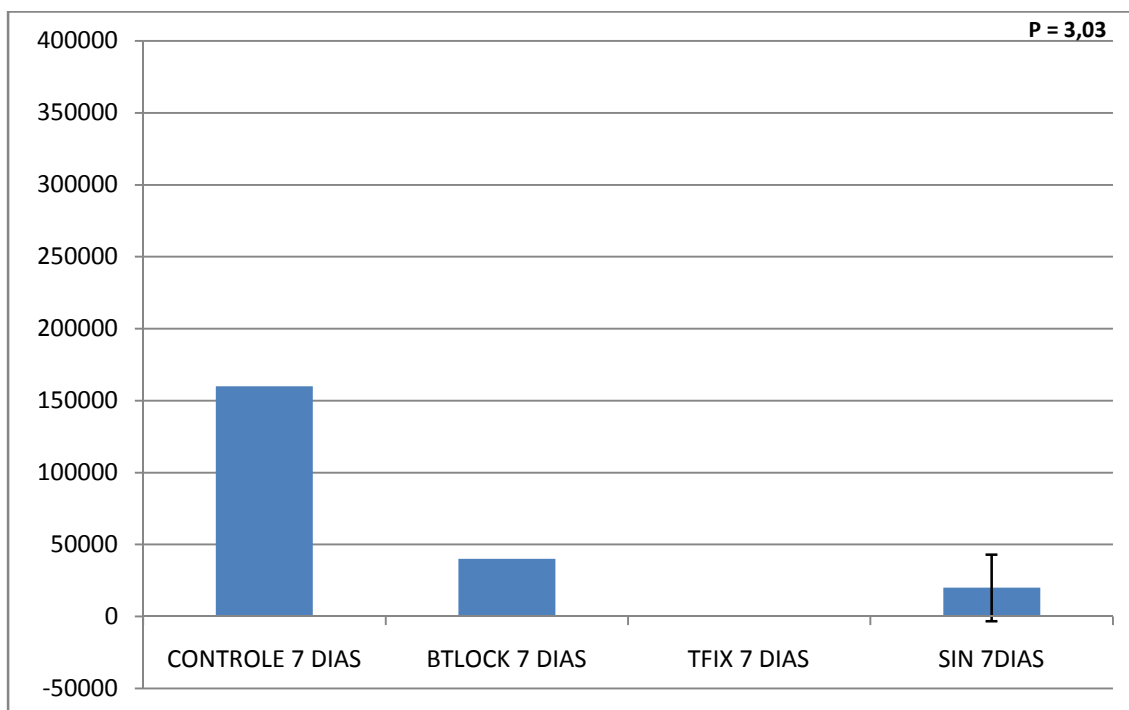


Figura 13 – Gráfico representando as médias dos valores de proliferação dos grupos, obtidos por microscopia de luz em 7 dias de proliferação.

5.2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Seguindo metodologia do estudo realizado por Lumbikanonda e Sammons (2001), onde os autores realizaram a contagem das células nas micrografias obtidas por MEV, decidimos realizar a mesma contagem em nossas micrografias, adotando os parâmetros já explicados nos Materiais e Métodos.

A contagem foi realizada nas micrografias obtidas de cada implante nos períodos de 24 horas, 72 horas e 7 dias, dos terços cervical, médio e apical, conforme evidencia a Figura 17.

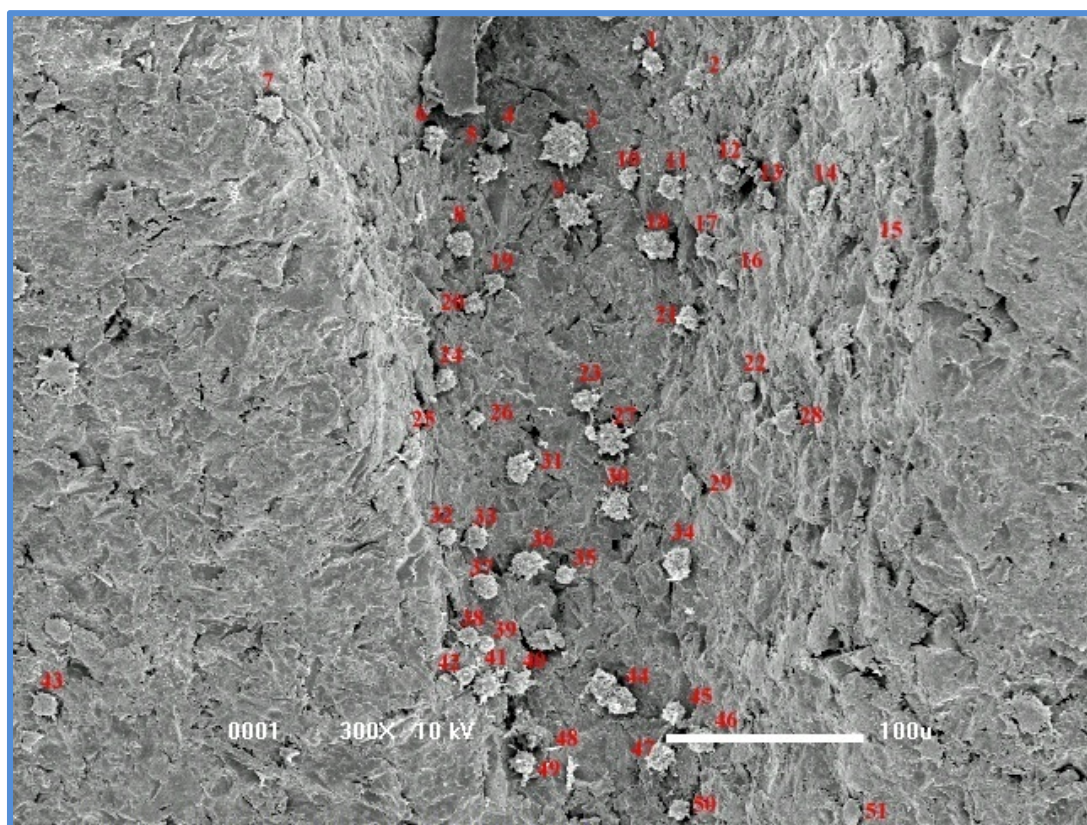


Figura 14 – Micrografia com aumento de 300x evidenciando a contagem das células aderidas em sua superfície.

Com a média dos dados obtidos na contagem das células nas superfícies dos implantes, realizou-se um teste ANOVA entre os grupos teste e o controle nos períodos de 24 horas, 72 horas e 7 dias.

No primeiro período avaliado (24 horas), existiu diferença significativa entre os grupos comparados (Tabelas 18 e 19).

Tabela 18 - Resumo dos dados estatísticos da análise em MEV para a proliferação celular no período de 24 horas dos grupos Controle, BTLock, TitaniumFix e SIN

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>Desvio Padrão</i>
CONTROLE 24h *	3	22	7,33	2,33	1,53
BTLOCK 24h *	3	68	22,67	14,33	3,79
T.FIX 24h *	3	43	14,33	12,33	3,51
SIN 24h *	3	153	51	679	26,06

* Significante para P<0,05 P = 0,017

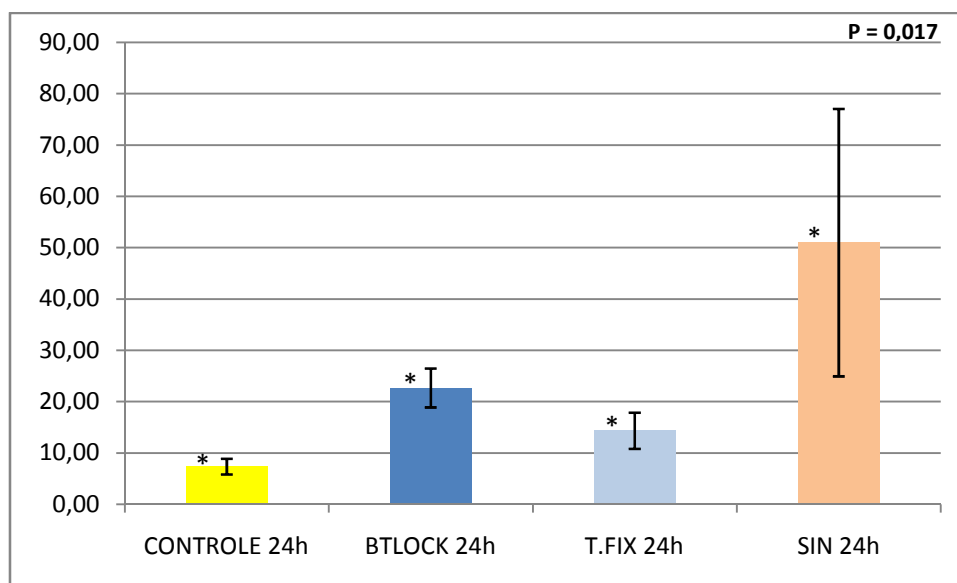
Tabela 19 - Teste ANOVA dos dados obtidos da proliferação celular por MEV para os grupos analisados no período de 24 horas

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3305,667	3	1101,889	6,225	0,017	4,066
Dentro dos grupos	1416	8	177			
Total	4721,667	11				

Assim, como existiu diferença significativa entre as médias dos grupos, aplicou-se o teste de Tukey-Kramer para verificar onde está a diferença significativa (Tabela 20). Na figura 18, representação gráfica das médias dos grupos avaliados e seus respectivos desvios.

Tabela 20 – Resultados do teste Tukey-Kramer para amostras avaliadas pela MEV no período de 24 horas de proliferação

<i>GRUPOS COMPARADOS</i>	<i>RESULTADO</i>
CONTROLE 24h e BTLOCK 24h	Existe diferença significativa entre os grupos comparados
CONTROLE 24h e T.FIX 24h	Existe diferença significativa entre os grupos comparados
CONTROLE 24h e SIN 24h	Existe diferença significativa entre os grupos comparados
BTLOCK 24h e T.FIX 24h	Existe diferença significativa entre os grupos comparados
BTLOCK 24h e SIN 24h	Existe diferença significativa entre os grupos comparados
T.FIX 24h e SIN 24h	Existe diferença significativa entre os grupos comparados



* Significante para $P < 0,05$

Figura 15 – Gráfico representando as médias dos valores de proliferação dos grupos, obtidos por MEV em 24 horas de proliferação.

Os dados obtidos pela MEV mostram que os grupos BTLock, TitaniumFix e SIN obtiveram um melhor resultado de proliferação no período de 24 horas quando comparados ao grupo controle.

No período de 72 horas de proliferação, não houve diferença significativa entre as médias dos grupos (Tabelas 21 e 22).

Tabela 21 - Resumo dos dados estatísticos da análise em MEV para a proliferação celular no período de 72 horas dos grupos Controle, BTLock, TitaniumFix e SIN

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>Desvio Padrão</i>
CONTROLE 72h	3	29	9,67	52,33	7,23
BTLOCK 72h	3	54	18	277	16,64
T.FIX 72h	3	86	28,67	265,33	16,29
SIN 72h	3	81	27	511	22,61

$P = 0,5092$

Tabela 22 - Teste ANOVA dos dados obtidos da proliferação celular por MEV para os grupos analisados no período de 72 horas

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	696,3333	3	232,1111	0,8397	0,5092	4,0662
Dentro dos grupos	2211,333	8	276,4167			
Total	2907,667	11				

No gráfico com as médias dos valores obtidos para cada grupo, observa-se que, da mesma forma que no período de 24 horas, os grupos teste obtiveram maiores médias que o grupo controle no período de 72 horas de proliferação (Figura 19).

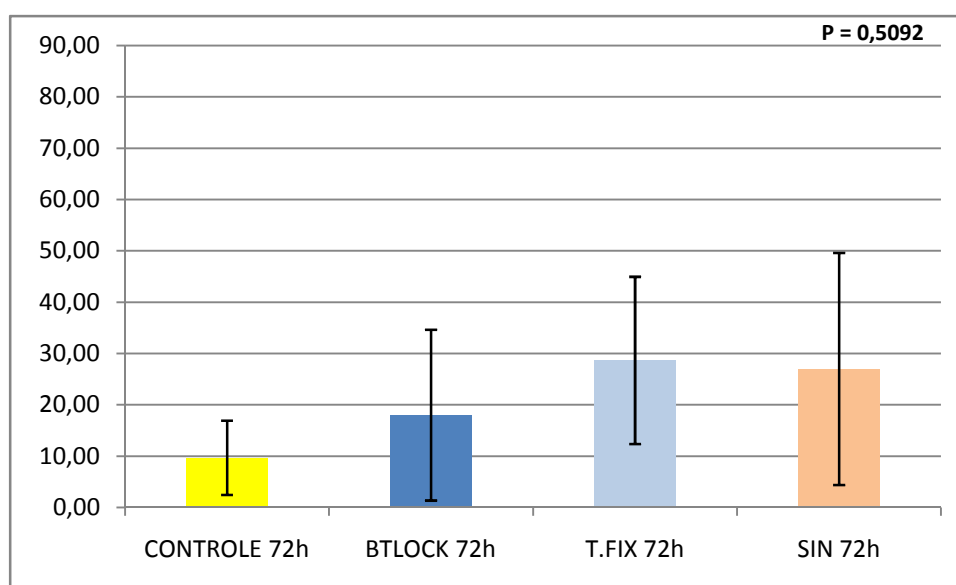


Figura 16 – Gráfico representando as médias dos valores de proliferação dos grupos, obtidos por MEV em 72 horas de proliferação.

No último período avaliado, a proliferação após 7 dias em cultura, também existiu diferença significativa entre os grupos (Tabelas 23 e 24).

Tabela 23 - Resumo dos dados estatísticos da análise em MEV para a proliferação celular no período de 7 dias dos grupos Controle, BTLock, TitaniumFix e SIN

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>Desvio Padrão</i>
CONTROLE 7d [▲]	3	46	15,33	86,33	9,29
BTLOCK 7d ^{▲*}	3	49	16,33	1,33	1,15
T.FIX 7d ^{†*}	3	109	36,33	210,33	14,50
SIN 7d ^{■▲}	3	27	9	3	1,73

Significante para $P < 0,05$ $P = 0,023$

[†] Significante comparado com o controle; [■] Significante comparado com BTLock; [▲] Significante comparado com Titanium Fix; ^{*} Significante comparado com SIN

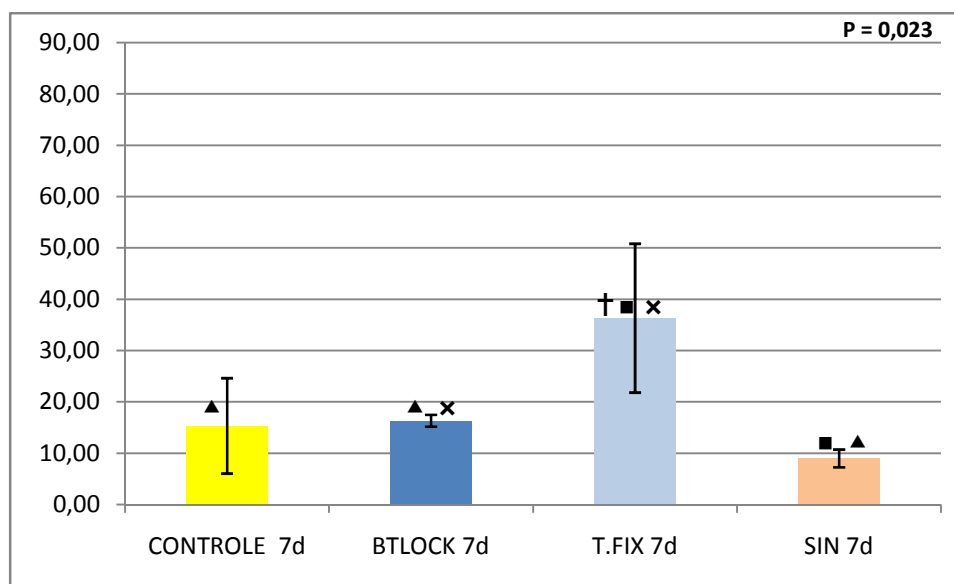
Tabela 24 - Teste ANOVA dos dados obtidos da proliferação celular por MEV para os grupos analisados no período de 7 dias

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1262,25	3	420,75	5,591	0,023	4,066
Dentro dos grupos	602	8	75,25			
Total	1864,25	11				

Como o valor-P mostrou haver significância entre os grupos analisados, da mesma forma que no período das 24 horas, procedeu-se com o teste de Tukey-Kramer para verificar onde está a diferença significativa (Tabela 25). O gráfico da figura 20 mostra as médias dos grupos analisados e seus desvios padrão.

Tabela 25 – Resultados do teste Tukey-Kramer para amostras avaliadas pela MEV no período de 7 dias de proliferação

GRUPOS COMPARADOS	RESULTADO
CONTROLE 7d e BTLOCK 7d	Não Existe diferença significativa entre os grupos comparados
CONTROLE 7d e T.FIX 7d	Existe diferença significativa entre os grupos comparados
CONTROLE 7d e SIN 7d	Não Existe diferença significativa entre os grupos comparados
BTLOCK 7d e T.FIX 7d	Existe diferença significativa entre os grupos comparados
BTLOCK 7d e SIN 7d	Existe diferença significativa entre os grupos comparados
T.FIX 7d e SIN 7d	Existe diferença significativa entre os grupos comparados



Significante para $P < 0,05$ † Significante comparado com o controle; ■ Significante comparado com BTLock; ▲ Significante comparado com Titanium Fix; * Significante comparado com SIN

Figura 17 – Gráfico representando as médias dos valores de proliferação dos grupos, obtidos por MEV em 7 dias de proliferação.

5.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM A MICROSCOPIA DE LUZ E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As médias, período a período, dos resultados obtidos com a microscopia de luz e com a MEV foram equiparados, lado a lado, na tabela 26 e gráficos com as tendências dos períodos estão demonstrados nas figuras 21 e 22.

Tabela 26 – Médias das amostras obtidas por microscopia de luz e MEV

GRUPOS	MÉDIAS		TEMPO
	DE LUZ	MEV	
CONTROLE	53333,33	7,33	24 horas
	160000	9,67	72 horas
	160000	15,33	7 dias
BTLock	100000	22,67	24 horas
	20000	18	72 horas
	40000	16,33	7 dias
TitaniumFix	40000	14,33	24 horas
	40000	28,67	72 horas
	0	36,33	7 dias
SIN	50000	51	24 horas
	120000	27	72 horas
	80000	27	7 dias

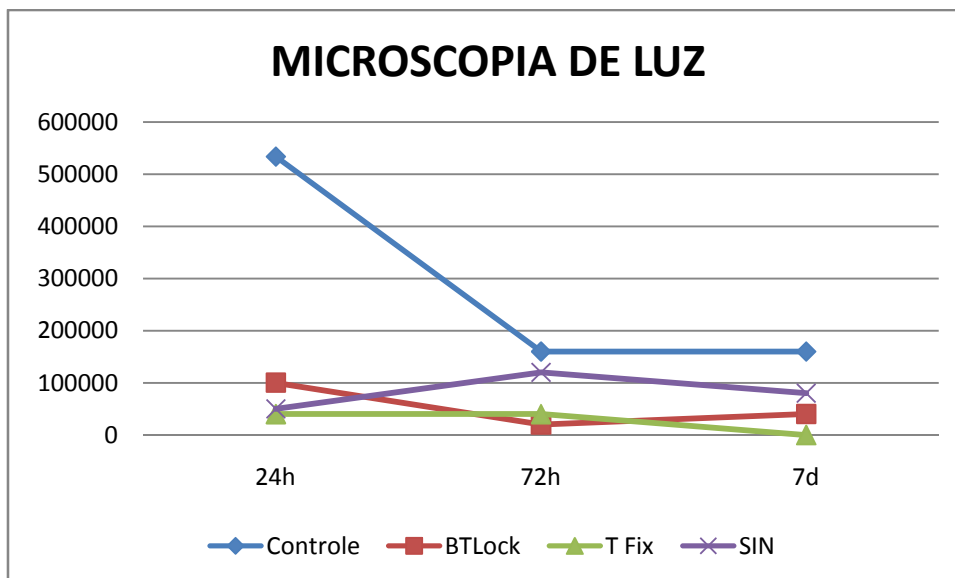


Figura 18 – Gráfico de tendência das médias dos grupos obtidas por microscopia de luz nos períodos de proliferação analisados

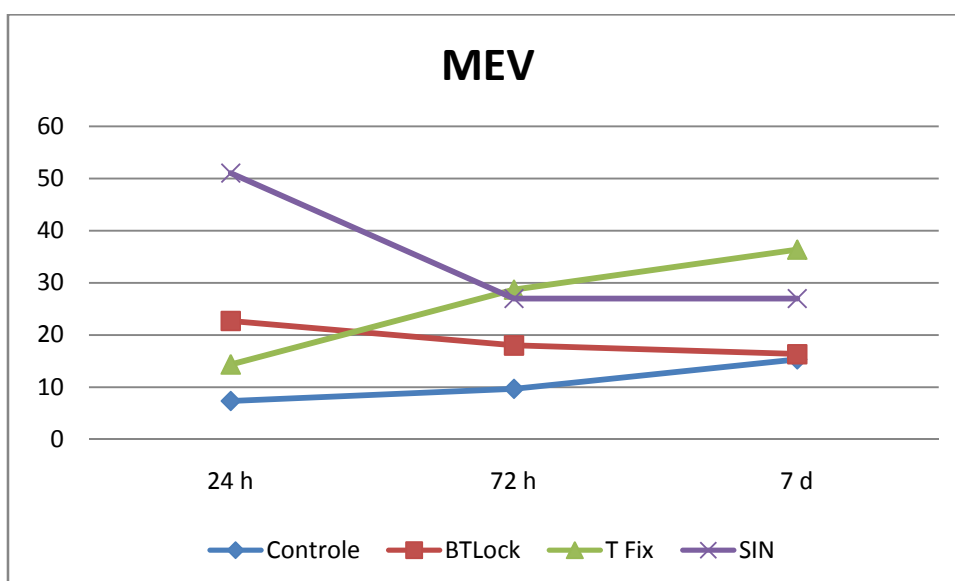


Figura 19 – Gráfico de tendência das médias dos grupos obtidas por microscopia eletrônica nos períodos de proliferação analisados

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 DISCUSSÃO DO MÉTODO

Seguindo a metodologia de Chiesa et al (2007), com algumas modificações, as células foram plaqueadas nas superfícies dos implantes e nas lamínulas e mantidas por 2 horas para a adesão. Aqui se modificou, com base nos estudos de Degasne et al (1999) e Ramires et al (2001), o tempo de adesão para 2 horas, diferentemente do que foi usado por Chiesa et al (2007), os quais mantiveram suas células para adesão por 1 hora. Esta conduta teve como objetivo obter um maior número de células aderidas nas lamínulas e nos implantes, já que a adesão inicial é o principal responsável pelo sucesso do implante (PONADER et al, 2008). Adotou-se, também de maneira diferente de Chiesa et al (2007), como grupo controle as lamínulas de vidro ao invés do próprio frasco de cultura, pois se encontrou um maior suporte na literatura, que traz relatos de diferentes comportamentos celulares nas superfícies de vidro (AHMAD, McCARTHY e GRONOWICZ, 1999; OKUMURA et al, 2001).

As amostras (implantes e lamínulas) foram mantidas em incubação para crescimento e posterior análise por períodos de 24 horas, 72 horas e 7 dias. Decidiu-se eliminar os períodos de 14 e 21 dias utilizados por Chiesa et al (2007) com o intuito de diminuir o tempo total do experimento, mas mantendo boa margem de observação da proliferação celular.

Já na metodologia empregada para a avaliação da proliferação celular por meio da microscopia de luz, se fez necessário a liberação das células da superfície dos implantes e lamínulas para a contagem. O resultado da microscopia de luz obtido apontou o grupo controle como aquele com a maior proliferação celular dentre os grupos testados. Tal resultado não se encontra consoante com os resultados vistos na literatura. Acredita-se que o mesmo aconteceu por uma ação ineficiente da tripsina na liberação das células das superfícies dos implantes. A tripsina conseguiu agir por completo nas lamínulas, já que a visualização das mesmas no microscópio óptico é possível e pôde-se constatar a ausência total de células em sua superfície, o que não é

possível ser feito com os implantes em microscopia de luz. Na MEV, tal situação não ocorreu e foi possível observar a presença das células na superfície dos implantes, já que não se faz necessário a liberação das mesmas para que a contagem seja realizada (LUMBIKANONDA e SAMMONS, 2001; SAMMONS et al, 2005).

A adesão das células à superfície do implante se faz através de glicoproteínas e da ECM de maneira semelhante à adesão nas superfícies dentais (DONLEY e GILLETE, 1991; JAYARAMAN et al, 2004) e a superfície rugosa dos implantes já mostrou influenciar as respostas celulares de adesão celular, proliferação, maior contato osso implante aumentando os torques de remoção mais do que a superfície lisa (KASEMO e LAUSMAA, 1988; BUSER et al, 1991; BOWERS et al, 1992; GROESSNER-SCHREIBER e TUAN, 1992; KELLER et al, 1994; WONG et al, 1995; BUSER et al, 1998; COOPER et al, 1999; LAZZARA et al, 1999; MUSTAFA et al, 2000; LINEZ-BATAILLON et al, 2002; POSTIGLIONE et al, 2003; SHALABI et al, 2006). A matriz extracelular produzida pelos osteoblastos é a responsável pela adesão dessas células a qualquer biomaterial e sua organização e produção determinam o grau de adesão celular aos materiais (JAYARAMAN et al, 2004). É de se esperar que, nos períodos de maior tempo de incubação, as células formem uma maior quantidade de matriz extracelular com uma maior organização protéica. Dessa forma, existe a possibilidade da tripsina não conseguir agir de maneira satisfatória sobre os implantes da mesma forma como o faz sobre as superfícies de vidro e do plástico do frasco de cultura. A aderência das células sobre as superfícies lisas de vidro é menor que sobre superfícies rugosas do titânio, o que pode ter causado menores médias de proliferação celular nas superfícies dos implantes quando comparadas às superfícies das lamínulas de vidro do grupo controle, dada a dificuldade em agir na aderência das células nos implantes.

A avaliação da proliferação celular através do ensaio de redução do azul de tetrazolium (MTT), que se baseia na atividade de uma enzima mitocondrial denominada de succinato desidrogenase, a qual reduz o MTT a um composto denominado cristais de formazan, cuja coloração é azul arroxeadado. Quanto maior o número de células se subentende que haverá maior atividade da enzima e maior formação de cristais de formazan. Decorrido um período de

três horas, o meio de cultura é removido e coloca-se um solvente, realizando-se, então, a leitura num espectrofotômetro ou num leitor ELISA à 570 nm e os dados são tabulados sempre relacionando com o grupo controle. Por ser um método que não depende da liberação das células das superfícies onde as mesmas se encontram em proliferação, o ensaio com o MTT além de ser de mais fácil execução, mostra-se mais fiel em seus resultados.

6.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Observou-se as estatísticas obtidas através dos dados coletados para a proliferação celular em todos os tempos avaliados, tanto para a microscopia de luz quanto para a MEV, e não existiu, período a período, semelhança entre eles. A microscopia de luz para o período de 24 horas mostrou uma melhor proliferação para o grupo BTLock (jateamento com duplo ataque ácido), enquanto a MEV apontou o grupo SIN (duplo ataque ácido) como aquele com melhor média de proliferação em relação aos demais grupos avaliados. No período de 72 horas, para a microscopia de luz foi observado um decréscimo na proliferação celular da superfície BTLock com aumento da média do grupo controle, que se apresentou como a melhor média absoluta entre os grupos testados, mas sem diferenças significativas entre os grupos. Na MEV, a superfície SIN também mostrou recuo em sua proliferação celular, sendo o grupo TitaniumFix o que se mostrou com a melhor média absoluta de proliferação entre os grupos, mas, estatisticamente, não existiu diferença entre os grupos analisados. No último período avaliado da proliferação, o período de 7 dias, na microscopia de luz o grupo controle continuou a se mostrar como o grupo com a melhor média de proliferação, mas sem diferenças significativas entre os grupos, enquanto na MEV o grupo TitaniumFix mostrou uma média de proliferação significativamente maior que os demais.

Conforme já apontado no tópico da discussão do método, existe um maior imbricamento das células com a superfície do implante quando comparado com a superfície lisa das lamínulas de vidro que compõem o grupo controle. Dessa forma, a liberação das células das superfícies do grupo

controle se mostraria mais favorável, levando a maiores números nas médias de proliferação do grupo controle quando comparadas às superfícies dos implantes dentais, sendo assim, consoante com os resultados obtidos na microscopia de luz deste estudo.

Os resultados mostram oscilações das médias nos resultados da microscopia de luz e da MEV (Tabela 26 e Figuras 21 e 22), divergindo dos resultados de Ramires et al (2001), Lavos-Valereto et al (2002) e Chiesa et al (2007), onde as células nas superfícies avaliadas sempre mostraram aumento em seus números. Observa-se que, com exceção do grupo SIN, a média dos demais grupos, na microscopia de luz para o período de 7 dias se mostrou menor que a média da primeira contagem da proliferação.

Em seu estudo com células osteoblásticas SaOS-2, Postiglione et al (2003) observaram que nos implantes com superfície tratada, quando comparado aos de superfície lisa, houve uma correlação inversa entre proliferação e diferenciação celular, onde as células proliferaram melhor nas superfícies lisas enquanto as rugosas favoreceram a diferenciação celular. As superfícies rugosas do implantes parecem induzir a diferenciação celular para as células de fenótipo osteoblástico, enquanto as lisas atuam melhor na proliferação. Como no presente estudo usamos apenas superfícies tratadas, não temos o parâmetro de comparação lisa x tratada, mas com base nos resultados de Postiglione et al (2003), as diferenças na proliferação celular entre as superfícies dos implantes estudados podem também ter ocorrido por diferenças na indução da diferenciação celular entre tais superfícies. Assim sendo, uma superfície pode induzir o início da diferenciação celular num intervalo de tempo menor quando comparada com as demais. Estudos posteriores podem observar tal fato e dar suporte a essa hipótese.

O presente trabalho com células possibilitou a observação do comportamento das mesmas sobre a superfície dos implantes e quais dessas superfícies influenciam positivamente na adesão e proliferação celular. Dessa forma, seria possível saber se alguma das superfícies estudadas seria capaz de levar a um tempo de osseointegração mais curto com segurança e previsibilidade deixando o campo aberto para estudos experimentais através de cargas protéticas em implantes com essas superfícies. Esses estudos podem comprovar a eficácia de tais superfícies quanto a serem capazes de

verdadeiramente reduzir o tempo de osseointegração com segurança e previsibilidade. Atualmente, os pacientes esperam respostas rápidas para todo o tipo de tratamento a que se submetam. Um tempo de espera de até 8 meses para que se possa iniciar a reposição protética de dentes perdidos com o uso de implantes dentais ainda é encarado como demasiado lento.

O presente estudo mostrou que os tratamentos de superfície avaliados não apresentaram diferenças entre si quanto à adesão celular, mas que o comportamento celular quanto à proliferação foi diferente em cada superfície. A superfície irregular, ou seja, tratada, mostrou influenciar, por si só, de maneira positiva a adesão celular, o que, por sua vez, influencia positivamente a osseointegração (GROESSNER-SCHREIBER e TUAN, 1992; LAZZARA et al, 1999; JAYARAMAN et al, 2004; SHALABI et al, 2006; CHIESA et al, 2007). O sucesso clínico dos implantes com superfície tratada com relação aos de superfície lisa nas áreas onde esses antes falhavam é um fato, muito embora estudos mostrem que, independente de haver ou não tratamento na superfície a osseointegração ocorre (BRUNETTE, 1988), ou até mesmo, segundo alguns autores, o tratamento de superfície não faz nenhuma diferença (CAMPOS, 2007) e até mesmo interfere na biocompatibilidade do titânio (XAVIER, 2002).

Para que haja a osseointegração se faz necessário a deposição óssea diretamente sobre a superfície do implante, sem qualquer outro tipo de tecido interposto. Como primeiro passo para que haja tal deposição, faz-se necessário a presença de células osteoblásticas na superfície do implante, sendo a adesão celular o ponto de partida da osseointegração.

Apesar deste estudo corroborar com os resultados apresentados pela literatura demonstrando que a topografia da superfície é um modulador do comportamento e da resposta celular (BOWERS et al, 1992; COOPER et al, 1999; DELIGIANNI et al, 2001; POSTIGLIONE et al, 2003) e que influencia também a adesão, proliferação, espalhamento, morfologia e alinhamento das células (DAVIES, LOWENBERG e SHIGA, 1990; MUSTAFA et al, 2000; LINEZ-BATAILLON et al, 2002; SAMMONS et al, 2005), estudos como o de Yliheikkilä et al (1996) levantam idéias contrárias baseadas em seus resultados, os quais apontam as condições da cultura celular como fatores que influenciam mais a resposta das células do que propriamente a rugosidade de superfície.

Bächle e Kohal (2004), afirmam em seu estudo que não existe distinção na diferenciação e proliferação celular entre as superfícies tratadas com jateamento e as tratadas com ataque ácido. O presente estudo demonstrou que as superfícies tratadas com jateamento e ataque ácido se comportaram e apresentaram resultados diferentes da superfície tratada apenas com ataque ácido, tendo essa última melhor desempenho no período de 24 horas de proliferação celular que as demais e estando equiparada nos resultados da adesão celular.

Tendo como parâmetros as respostas celulares de adesão e proliferação, a intenção deste estudo foi observar qual das superfícies obteria melhores resultados frente às células osteoblásticas. O uso de células para testes de implantes e biomateriais (DAVIES, LOWENBERG e SHIGA, 1990; BOWERS et al, 1992; GROESSNER-SCHREIBER e TUAN, 1992; KELLER et al, 1994; YLIHEIKKILÄ et al, 1996; AHMAD, MCCARTHY e GRONOWICZ, 1999; COOPER et al, 1999; MUSTAFA et al, 2000; DELIGIANNI et al, 2001; LUMBIKANONDA e SAMMONS, 2001; OKUMURA et al, 2001; LINEZ-BATAILLON et al, 2002; POSTIGLIONE et al, 2003; JAYARAMAN et al, 2004; GALLI et al, 2005; LAVOS-VALERETO et al, 2005; SADER et al, 2005; SAMMONS et al, 2005; CHIESA et al, 2007; QU et al, 2007; PONADER et al, 2008), bem como no campo da engenharia e terapia celular são vistos como promissores. Este estudo ratifica os resultados vistos na literatura com o uso de células para testes de superfícies de implantes e deixa um campo aberto para outras pesquisas seguindo a metodologia empregada. A avaliação celular através da tripsinização para a contagem em microscopia de luz não se mostrou eficiente neste estudo com implantes dentais comerciais e de uso na clínica. Outros métodos de avaliação da proliferação celular como, por exemplo, através do ensaio de redução do azul de tetrazolium (MTT) podem ser utilizados por se apresentarem mais simples e eficientes (RAMIRES et al, 2001; POSTIGLIONE et al, 2003; SADER et al, 2005; CHIESA et al, 2007).

É fato a adesão e proliferação de células na superfície dos implantes *in vitro*, o que pode propiciar, num futuro próximo, a instalação de implantes já com células colhidas dos próprios pacientes aderidas e em proliferação na superfície do implante como forma de reduzir o tempo de osseointegração.

A literatura consultada com base nos estudos prévios de cultura celular destinado a verificação de adesão e proliferação celular nas superfícies de implantes são inúmeros. Os autores se utilizam de técnicas e métodos diferentes (AHMAD, McCARTHY, GRONOWICZ, 1999; LUMBIKANONDA e SAMMONS, 2001; LAVOS-VALERETO, et al 2002; SADER et al, 2005; SAMMONS et al, 2005) e de uma forma ou de outra os resultados estatísticos demonstram uma atmosfera favorável à proliferação dessas células. Dessa forma, observa-se que os resultados *in vitro* encorajam os profissionais a utilizarem estes implantes em sua prática diária. Neste estudo não foi diferente. A metodologia, os resultados estatísticos e a proliferação celular conseguida neste trabalho seguem o mesmo padrão obtido pelos pesquisadores da literatura mundial. É claro que se seguiu metodologia própria, mas os resultados apontam para uma indicação clínica do uso destes implantes, independente da marca. Em seu trabalho, Ponader et al (2008) afirmam que a adesão inicial das células é o principal responsável pelo posterior sucesso da osseointegração. Esta afirmativa vem corroborar com os achados desta pesquisa, que não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados no quesito adesão celular nas duas primeiras horas, conforme se vê nas tabelas 05 e 06 e na figura 09.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Diante de nosso trabalho de pesquisa e após toda a análise estatística dos dados podemos inferir que:

1) Através do teste de adesão celular, as superfícies utilizadas em nosso estudo não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre si;

2) A proliferação celular no período de 24 horas sob microscopia eletrônica de varredura demonstrou ser o grupo com a superfície tratada por duplo ataque ácido, dentre os grupos testados, aquele com a maior proliferação celular;

3) No período de 72 horas, as superfícies avaliadas não mostraram diferença significativa sob a análise em microscopia eletrônica de varredura;

4) O grupo com a superfície tratada por jateamento e ataque ácido demonstrou ter a maior proliferação celular dentre os grupos testados no período de 7 dias sob microscopia eletrônica de varredura;

5) A avaliação da proliferação celular através da microscopia de luz pela liberação das células da superfície do implante por meio da tripsina não se mostrou eficiente em nosso estudo;

6) Todas as superfícies se mostraram biocompatíveis, uma vez que não interferiram na proliferação das células osteoblásticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS⁶

AHMAD, M; McCARTHY, M; G GRONOWICZ. An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. **Biomaterials**, v.20, p 211-220, 1999.

BÄCHLE, M; KOHAL, R. J. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. **Clin Oral Impl Res**, v.15, p. 683-692, 2004.

BOWERS, K. T. et al. Optimization of Surface Micromorphology for Enhanced Osteoblast Responses In Vitro. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.7, p. 302-310, 1992.

BRUNETTE, D. M. The Effects of Implant Surface Topography on the Behavior of Cells. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 3, p. 231-246, 1988.

BUSER, D et al. Influence of Surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. **J Biomed Mater Res**, v.25, p. 889-902, 1991.

BUSER, D et al. Removal Torque Values of Titanium Implants in the Maxilla of Miniature Pigs. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.13, p. 611-619, 1998.

BUSER, D et al. Enhanced Bone Apposition to a Chemically Modified SLA Titanium Surface. **J Dent Res** 83, v.7, p. 529-533, 2004.

CAMPOS, E. L. C. **Análise físico-química e biológica de duas superfícies de implantes osseointegráveis de uso odontológico**. 138p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Veiga de Almeida, Rio de Janeiro, 2007.

CHIESA, R et al. In vitro and in vivo performance of a novel surface treatment to enhance osseointegration of endosseous implants. **Oral Sur Oral Med ORal Pathol Oral Radiol Endod**, v. 103, p. 745-756, 2007.

⁶ Lista de todas as fontes citadas, segundo norma ABNT NBR-6023/02.

COCHRAN, D. L et al. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with sandblasted and acid-etched surface: A histometric study in the canine mandible. **J Biomed Mater Res**, v.40, p. 1-11, 1998.

COOPER, L. F. et al. Generalizations Regarding the Process and Phenomenon of Osseointegration. Part II. In vitro Studies. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 13, p. 163-174, 1998.

COOPER, L. F et al. Formation of Mineralizing Osteoblast Cultures on Machined, Titanium Oxide Grit-Blasted, and Plasma-Sprayed Titanium Surfaces. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.14, p. 37-47, 1999.

COOPER, L. F. A role surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. **J Prosthetic Dent**, v. 84, n.5, p. 522-533, novembro de 2000.

DAVIES, J. E; LOWENBERG, B; SHIGA, A. The bone-titanium interface in vitro. **J Biomed Mater Res**, v. 24, p. 1289-1306, 1990.

DEGASNE, I. et al. Effects of Roughness, Fibronectin and Vitronectin on Attachment, Spreading, and Proliferation of Human Osteoblast-Like Cells (Saos-2) on Titanium Surfaces. **Calcif Tissue Int.**, v. 64, p. 499-507, 1999.

DELIGIANNI, D. D et al. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. **Biomaterials**, v. 22, p. 1241-1251, 2001.

DENISSEN, H. W et al. Eleven-year study of hydroxyapatite implants. **J Prosthet Dent**, v. 61, n. 6, p. 706-712, 1989.

DONLEY, T. G; GILLETTE, W. B. Titanium Endosseous Implant-Soft Tissue Interface: A Literature Review. **J Periodontol**, v. 62, n. 3, p. 153-160, 1991.

GALLI, C et al. Comparison of Human Mandibular Osteoblasts Grown on Two Commercially Available Titanium Implant Surfaces. **J Periodontol**, v. 76, p. 364-372, 2005.

GERMANIER, Y et al. Enhanced bone apposition around biofunctionalized sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces: A histomorphometric study in miniature pigs. **Clin Oral Impl Res**, v. 17, p. 251-257, 2006.

GROESSNER-SCHREIBER, B; TUAN, R. S. Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces in vitro. **Journal of Cell Science**, v. 101, p. 209-217, 1992.

GROISMAN, M; VIDIGAL Jr, G. M. Tipos de Superfícies de Implantes. In: PAIVA, J. S; ALMEIDA, R. V. **Implantodontia: A atuação clínica baseada em evidências científicas**. 2 Ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005. cap. 03, p. 39-52.

JAYARAMAN, M. et al. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. **Biomaterials**, v. 25, p. 625-631, 2004.

KASEMO, B. Biocompatibility of titanium implants: Surface science aspects. **J Prosthet Dent**, v. 49, n.6, p. 832-837, 1983.

KASEMO, B; LAUSMAA, J. Biomaterial and Implant Surfaces: A Surface Science Approach. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 3, p. 247-259, 1988.

KELLER, J. C et al. Characterizations of titanium implant surfaces. III. **J Biomed Mat Res**, v. 28, n. 8, p. 939-946, 1994.

KIM, Y et al. A Histomorphometric Analysis of the Effects os Various Surface Treatment Methods on Osseointegration. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 18, p. 349-356, 2003.

LAVOS-VALERETO, I. C et al. Evaluation of the Titanium Ti-6AL-7Nb Alloy With and Without Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coating on Growth and Viability of Cultured Osteoblast-Like Cells. **J Periodontol**, v. 19, n. 02, p. 900-905, 2002.

LAZZARA, R. J et al. A Human Histologic Analysis of Osseotite and Machined Surfaces Using Implants with 2 Opposing Surfaces. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 73, p. 117-129, 1999.

LI, J. Behaviour of titanium and titania-based ceramics in vitro and in vivo. **Biomaterials**, v.14, n.3, p. 229-232, 1993.

LINEZ-BATAILLON, P et al. In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates. **Biomolecular Engineering**, v. 19, p. 133-141, 2002.

LUMBIKANONDA, N; SAMMONS, R. Bone Cell Attachment to Dental Implants of Different Surface Characteristics. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.16, p. 627-636, 2001.

MUSTAFA, K. Effects of titanium surfaces blasted with TiO₂ particles on the initial attachment of cells derived from human mandibular bone: A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. **Clin Oral Impl Res**, v. 11, p. 116–128, 2000.

NAGEM FILHO, H et al. Influência da textura superficial dos implantes. **Revista Odonto Ciência**, v. 22, n. 55, p. 82-86, jan./mar. 2007.

OKUMURA, A et al. Substrate affects the initial attachment and subsequent behavior of human osteoblastic cells (Saos-2). **Biomaterials**, v. 22, p. 2263-2271, 2001.

PARR, G. R; GARDNER, L. K; TOTH, R. W. Titanium: The mystery metal of implant dentistry. Dental material aspects. **J Prosthet Dent**, v. 54, n. 3, p. 410-414, 1985.

PEBÉ, P et al. Countertorque testing and Histomorphometric Analysis of Various Implant Surfaces in Canines: a pilot study. **Implant Dent**, v.6, n. 4, p. 259-265, 1997.

PONADER, S et al. Effects of topographical surface modifications of electron beam melted Ti-6Al-4V titanium on human fetal osteoblasts. **J Biomed Mater Res**, v.84A, p. 1111-1119, 2008.

POSTIGLIONE, L et al. Behaviour of SaOS-2 Cells Cultured on Different Titanium Surfaces. **J Dent Res**, v.82, n.7, p. 692-696, 2003.

QU, Z et al. The initial attachment and subsequent behavior regulation of osteoblasts by dental implant surface modification. **J Biomed Mater Res**, v. 82A, p. 658-668, 2007.

RAMIRES, P. A. et al. The influence of titania/hydroxiapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behavior. **Biomaterials**, v. 22, p. 1467-1474, 2001.

SADER, M. S et al. Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation. **Clin Oral Impl Res**, v.16, p. 667-675, 2005.

SAMMONS, R. L et al. Comparison of osteoblast spreading on microstructured dental implant surfaces and cell behaviour in an explant model of osseointegration: A scanning electron microscopic study. **Clin Oral Impl Res**, v. 16, p. 657-666, 2005.

SHALABI, M. M et al. Implant Surface Roughness and Bone Healing: a Systematic Review. **J Dent Res**, v.85, n. 6, p. 496-500, 2006.

SZMUKLER-MONCLER, S; TESTORI, T; BERNARD, J. P. Etched implants: A comparative Surface Analysis of Four Implant Systems. **J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater**, v. 69B, p. 46-57, 2004.

TEIXEIRA, E. R. Superfícies dos Implantes O estágio atual. In: DINATO, J. C; POLIDO, W. D. **Implantes Osseointegrados: Cirurgia e Prótese**. 1a Ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001. cap. 5, p. 63-80.

WENNENBERG, A; ALBREKTSSON, T; LINDHE, J. Topografia da Superfície de Implantes de Titânio. In: LINDHE, J; KARRING, T; LANG, N. P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 4a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap. 34, p.799-806.

WILLIAMS, D. F. Titanium: epitome of biocompatibility or cause for concern. **J Bone Joint Surg (Br)**, v. 76-B, n.3, p. 348-349, maio de 1994.

WONG, M et al. Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. **J Biomed Mater Res**, v.11, p. 1567-1575, 1995.

XAVIER, S. P. **Caracterização e avaliação da biocompatibilidade do titânio submetido a diferentes tratamentos de superfície.** 104p. Tese (Doutorado em Cirurgia Buco-Maxilo-Facial). Universidade Estadual Paulista - Araçatuba, 2002.

YLIHEIKKILÄ, P. K et al. Preliminary Comparison of Mineralizing Multilayer Cultures Formed by Primary Fetal Bovine Mandibular Osteoblasts Grown on Titanium, Hydroxyapatite, and Glass Substrates. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 29, n. 12, p. 456-465, 1996.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de
Santo Amaro



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP



UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Comitê de Ética em Pesquisas
Registro CONEP n.º 306
Aprovado em 16/05/2000

PARECER N.º 074/2008

REGISTRO CEP UNISA N.º 146/08

Projeto de Pesquisa: "Avaliação de superfície tratada de implantes dentais através de cultura imortalizada de células"

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk e
Pós-Graduando: Ennyo Sobral Crispim da Silva

Faculdade: Odontologia/Implantodontia

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, cabe a seguinte consideração:

As informações apresentadas atendem aos aspectos fundamentais das Resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa (**CEP-UNISA**), de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do projeto "Avaliação de superfície tratada de implantes dentais através de cultura imortalizada de células"

São Paulo, 27 de Agosto de 2008.

Prof. Dr. Carlos de Sousa Lucci
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
UNISA - Universidade de Santo Amaro