

UNIVERSIDADE VEIGA DE ALMEIDA

Luis Eduardo Carneiro Campos

**“ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE DUAS
SUPERFÍCIES DE IMPLANTES OSTEINTEGRÁVEIS DE
USO ODONTOLÓGICO”**

Rio de Janeiro

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Luis Eduardo Carneiro Campos

**“ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE DUAS
SUPERFÍCIES DE IMPLANTES OSTEOINTEGRÁVEIS DE
USO ODONTOLÓGICO”**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado profissionalizante em odontologia da Universidade Veiga de Almeida, como requisito parcial para a obtenção de Grau de Mestre. Área de Concentração: Reabilitação Oral

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Maria Namen

Co-Orientador: Prof. Dr. Alex Balduino

Rio de Janeiro
2007

C198a Campos, Luis Eduardo Carneiro

Análise físico-química e biológica de duas superfícies de implantes osteointegráveis de uso odontológico / Luis Eduardo Carneiro Campos – 2007.

138p. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Veiga de Almeida, Mestrado em Odontologia, Reabilitação Oral, Rio de Janeiro, 2007.

Orientação: Fátima Maria Namen

Co-orientação: Alex Balduino

1. Implantes dentários. 2. Adesão 3. Instrumentos e aparelhos odontológicos. I.Namen, Fátima Maria (orientadora). II. Balduino, Alex (co-orientador). III. Universidade Veiga de Almeida, Mestrado em odontologia. Reabilitação Oral. III. Título –

CDD – 617.632

Luis Eduardo Carneiro Campos

**“ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE DUAS
SUPERFÍCIES DE IMPLANTES OSTEOINTEGRÁVEIS
DE USO ODONTOLÓGICO”**

Dissertação apresentada ao curso mestrado
profissionalizante em odontologia da
Universidade Veiga de Almeida, como
requisito parcial para a obtenção de Grau de
Mestre. Área de concentração: Reabilitação
Oral.

Aprovada em: 27/09/2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Galan Júnior
Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP

Prof.^a Dr.^a Maria Eugênia Leite Duarte
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ/INTO

Prof. Dr. Mauro Granjeiro
Faculdade de Odontologia de Campinas – USP/UFF

À minha esposa Patrícia, filhos
Anneliese e Leonardo e meu
afilhado Sávio, que são o ele entre o
meu passado e o meu futuro.

Agradeço ao Grande Arquiteto do Universo, Deus de amor e bondade, por nos ter dado o sopro da vida!

Aos meus avós, Luiz, Selva, José e Otília. Meus pais, Leônidas e Maria Selva, por suas privações físicas, psíquicas e financeiras por seus netos, filhos e pelo próximo!

À minha Tia Beth, que foi mãe para que meus pais pudessem ser mais do que pais!

Aos meus irmãos Antonio José, Augusto César e Tatiana, que me ensinaram a importância em compartilhar nossas experiências, sejam elas boas, ou, “não tão boas”!

A Artur e Magda Becker, meus “pais postiços”, por terem acreditado em mim desde nosso primeiro encontro, e estarem sempre presentes em nossas vidas!

Ao meu paciente, a quem devo todo o meu respeito e gratidão por sua crença e fidelidade!

Ao meu amigo, sócio e “irmão”, Hernando; um dos “culpados” por tudo o que vem a seguir!

A Sérgio e Eneida que estiveram comigo desde os nossos “primeiros passos”.

À minha Amiga, que se tornou minha Orientadora, Prof^a. Dr^a. Fátima Maria Namen, por ser tão exigente, e ter norteado um sonho, estando ao meu lado, desde a sua criação, abdicando de sua própria vida!

Ao Prof. Dr. João Galan Júnior, por sua sensibilidade e simplicidade na resolução de problemas que por hora pareciam insolucionáveis! Característica própria dos iluminados!

À Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Leite Duarte, Diretora Científica do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, que acreditou em nosso ideal; e nos proporcionou a entrada ao maravilhoso mundo das células ósseas!

Ao Cirurgião Dentista Rodrigo Derossi Cabreira, por sua dedicação integral e amor à pesquisa, livre de sofismas, tão naturais aos homens!

Ao Prof. Dr. Alex Balduino, meu Co-orientador, por sua infundável presteza e dedicação em nosso trabalho! Homem digno dos maiores agradecimentos, comprometido integralmente com o bem estar da humanidade!

A Bióloga Melissa Leitão, do Centro de Pesquisa em Terapia Celular e Bioengenharia Ortopédica do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), por todas as horas e comprometimento dedicados à pesquisa apesar de toda a sua juventude! Característica pouco reconhecida em jovens nos dias atuais!

À Prof^a. Márcia Soares Sader, por toda a sua atenção e carinho, nos proporcionando “a visão além do alcance”, com belíssimas imagens e extrema precisão!

Ao Prof. Dr. Mauro Granjeiro, por ter aceitado abrilhantar nossas colunas.

Ao professor Dr. Sérgio Kahn por sua presteza na revisão desta dissertação.

À NEODENT Implante Osteo-integrável, nas pessoas do Prof. Dr. Geninho, Prof^a. Dr^a. Ivete, Prof. Dr. Padovan, Engenheiro Alexander, Cíntia e Vanessa, que acreditaram em nós desde o “primeiro telefonema”!

Ao Dr. Per-Ingvar Brånemark, por seu altruísmo, e por nos der dado a possibilidade de tornar feliz a humanidade!

A Mário Groisman, por ter me iniciado na Arte da Implantodontia!

Aos amigos da ABO – Niterói, “onde tudo começou”, Raul Feres Monte Alto Filho, José Carlos da Luz, Herval Nunes Ramos Filho, Luciano da Silva Dias e Edson Murta.

À José Henrique Cavalcanti Lima, que continuando, poliu a pedra bruta!

À Paulo Ribeiro, exemplo de caráter, hombridade e ética, que me proporcionou o ingresso na vida acadêmica, confiando-me seus alunos sem ao menos questionar -: “De onde vindes?”

À Bibliotecária Gisele por sua paciência e determinação em tantas consultas bibliográficas!

Aos amigos do Mestrado, que compartilharam da difícil arte de acreditar que somos capazes de realizar todos os nossos sonhos; pois tudo que existe ou existiu, começou com um sonho!

E no “apagar das luzes.....” (MESMO!) ao grande amigo, Ferrandini!

Enfim, a todos aqueles que têm por objetivo tornar feliz a Humanidade, pela igualdade, pelo aperfeiçoamento dos costumes, pelo combate ao vício e a ignorância, pela tolerância a individualidade e a crença de cada um.

“A simplicidade é o último degrau da sabedoria.”
Gibran

RESUMO

O objetivo da presente pesquisa foi analisar as características físicas, químicas e biológicas de dois tipos de superfícies de implantes osteointegráveis manufaturadas para uso em odontologia. Superfícies maquinadas (Mq) e com tratamento superficial (ST) foram analisadas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), perfilômetro de contato, espectroscopia de energia dispersiva (EDS), goniômetro e cultura de células do estroma da medula óssea humana. Foram notadas diferenças significantes na topografia e potencial de molhabilidade entre as superfícies testadas. Apesar da significativa diferença da rugosidade superficial (R_a) (teste de Wilcoxon / $p < 0,05$) entre as superfícies maquinadas e tratadas, ambas apresentaram um alto grau de lisura. Todavia as superfícies tratadas tiveram uma capacidade de molhabilidade maior que as maquinadas. Os ângulos de contato tiveram diferenças significantes entre maquinadas e tratadas (teste de Tukey / $p < 0,001$). A análise ao EDS observou uma alta concentração de titânio em ambas as superfícies testadas. A contagem de células aderidas (método duplo cego) sobre as distintas superfícies mostrou não haver diferença significativa na adesão das células estromais sobre estas após 18 horas (teste de Mann Whitney / $p > 0,05$). O presente estudo 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 interferência no fenômeno da adesão.

Palavras Chave: Adesão, implante, superfície, microscópio eletrônico de varredura, molhabilidade, células estromais, cultura de células.

ABSTRACT

The aim of our study was to analyze physically, chemically and biologically characteristics of two kinds of implant surfaces used in dentistry. Machined (Mq) and treated surfaces (TS) have been analyzed using scanning electronic microscope (SEM), profilometer, energy dispersing spectroscopy (EDS), goniometer and human marrow stromal cells culture. Significant differences have been noted on the topography and wettability of the tested surfaces. Despite the significant difference of surface roughness average (R_a), (Wilcoxon test / $p < 0,05$) among treated surfaces and machined surfaces, both have presented a high degree of flatness. However, treated surfaces presented a high level of wettability when compared to machined surfaces. Contact angles have presented considerable differences between treated and machined surfaces (Tukey test $p < 0.001$). EDS analysis showed a high degree of titanium on both tested surfaces. Adhered cells counting on both types of surfaces showed there is no significant in stromal cells adhesion after 18 hours (Mann Whitney test $p > 0.05$). The present study concludes that modifications on the titanium implant surfaces roughness may promote significant differences on the morphology of bone marrow stromal cells. Nevertheless in the microenvironment, no interference adhesion phenomenon was noted.

Key Words: Adhesion, implant, surface, scanning electronic microscope, wettability, stromal cells, cell culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Esquema macroscópico da estrutura da diáfise em ossos longos, p. 26
- Figura 2 – Cunha de corte. Mecanismo da remodelação óssea, p. 32
- Figura 3 – Regeneração tecidual baseada em princípios de bioengenharia, p. 36
- Figura 4 – Ângulo de contato, p. 39
- Figura 5 – Estágios da adesão celular, p. 45
- Figura 6 – Auto renovação da célula-tronco, p. 47
- Figura 7 – Arquitetura da medula óssea (adaptado). A interação entre os sistemas hematopoiético e estromal, p. 50
- Figura 8 – Representação da pluripotencialidade das células tronco mesenquimais encontradas na medula óssea de rato adulto, p. 53
- Figura 9 – As diversas linhagens de células do estroma da medula óssea, p. 55
- Figura 10 – Figura ilustrativa de um implante osteointegrável de Ø 4.0, p. 59
- Figura 11 – Diferentes topografias de superfícies de implantes, p. 61
- Figura 12 – Figura demonstrativa da morfologia fusiforme da população de células estromais aderidas ao plástico (garrafa de cultura) observadas ao microscópio invertido, p. 80
- Figura 13 – Figura demonstrando o *pellet* (grumos) aderido ao tubo Falcon, após centrifugação, p. 81
- Figura 14 – Figura ilustrativa da câmara de Neubauer, utilizada na contagem de células durante o procedimento de cultura, p. 82
- Figura 15 – Figura demonstrativa do plaqueamento dos discos em cabine de fluxo laminar para análise de adesão, p. 82
- Figura 16 – Figura representativa da microscopia eletrônica de varredura de um implante Ø 4.0X9. Titamax Ti cortical – Neodent Implante Osteointegrável, Curitiba, PR), p. 87
- Figura 17 – Espectroscopia de energia dispersiva (implante Ø 4.0X9. Titamax Ti cortical (Neodent Implante Osteointegrável, Curitiba, PR), p. 88

- Figura 18 – Espectroscopia de energia dispersiva (disco de titânio maquinado – Neodent Implante Osteointegrável, Curitiba, PR), p. 88
- Figura 19 – Espectroscopia de energia dispersiva (disco de titânio tratado – Neodent Implante Osteointegrável, Curitiba, PR), p. 89
- Figura 20 – Análise topográfica dos discos (MEV), p. 91
- Figura 21 – Gráfico representativo da rugosidade média (R_a) e desvios padrão entre os discos maquinado e tratado, p. 92
- Figura 22 – Gráfico representativo dos ângulos de contato e desvios padrão em discos de titânio maquinado e tratado, p. 93
- Figura 23 – Figura demonstrativa das células estromais aderidas às distintas superfícies (análise de retroespalhamento ao microscópio eletrônico de varredura), p. 95
- Figura 24 – Gráfico das médias da contagem total de células e desvios padrão em discos maquinados e tratados após 18 horas, p. 96
- Figura 25 – Figura demonstrativa das células estromais aderidas sobre as superfícies ao microscópio eletrônico de varredura, p. 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quadro comparativo de células com comprometimento osteoblástico utilizadas em procedimentos de culturas, p. 45

Tabela 2 – Apresentação dos dados relacionados aos corpos de prova, p. 76

Tabela 3 – Divisão dos corpos de prova, p. 78

Tabela 4 – Média, desvio padrão e erro padrão dos valores da rugosidade dos espécimes em forma de discos, p. 90

Tabela 5 – Teste de Wilcoxon aplicado à tabela 4, p. 90

Tabela 6 – Médias, desvio padrão e erro padrão dos valores dos ângulos de contato dos espécimes, p. 93

Tabela 7 – Valor de p, número de grupos e frequência aplicados à tabela 6 (ANOVA), p. 93

Tabelas 8 – Teste de Tukey aplicado aos valores do apêndice 3 (ANOVA) – maquinadas X tratadas, p. 94

Tabela 9 – Média, desvio padrão e erro padrão da contagem de células aderidas, p. 96

Tabela 10 – Teste de Mann Whitney aplicado aos valores da tabela 9 – adesão (maquinados X tratados) após 18 horas, p. 96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Média, desvio padrão e erro padrão (perfilometria), p. 130

Quadro 2 – Teste de Wilcoxon aplicado ao quadro 1 (perfilometria), p. 131

Quadro 3 – Média, desvio padrão e erro padrão (contagem de células), p. 132

Quadro 4 – Teste de Mann Whitney aplicado ao quadro 3 (contagem de células), p. 133

Quadro 5 – Ângulo de contato (ANOVA), p. 133

Quadro 6 – Teste de Tukey (ângulo de contato), p. 134

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

| | | |
|------------------|---|---|
| > | - | Maior |
| < | - | Menor |
| = | - | Igual |
| + | - | Mais |
| 3D | - | Três Dimensões |
| AB | - | Forças Ácido-Base de Lewis |
| ALP | - | <i>Alkaline Phosphatase</i> (Fosfatase Alcalina) |
| ASTM | - | <i>American Society for Testing Materials</i> |
| BMU | - | <i>Basic Multicellular Unit</i> (Unidade Básica multicelular) |
| BMSCs | - | <i>Bone Marrow Stromal Cells</i> (Células do Estromais da Medula Óssea) |
| BSP | - | <i>Bone Sialoprotein</i> (Sialoproteína óssea) |
| °C | - | Graus Celsius |
| Ca ⁺⁺ | - | Íon cálcio |
| CAD | - | <i>Computer-Aided-Design</i> (Desenho auxiliado pelo computador) |
| Cbfa-1 | - | <i>Core Binding Factor</i> (Fator de transcrição genética na diferenciação celular) |
| CEP | - | Comitê de Ética em Pesquisa |
| CFU-O | - | Colônias de formações osteogênicas |
| CFU-F | - | Unidades Formadoras de Colônia com aspecto fibroblastóide |
| cm | - | Centímetros |
| cpTi | - | Titânio Comercialmente Puro |
| CT | - | Calcitonina (Hormônio) |
| CTCel | - | Centro de Terapia Celular e Bioengenharia Ortopédica |
| Dex | - | Dexametasona |
| DNA | - | Ácido desoxirribonucléico |
| DMEM | - | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (Meio de Cultura) |
| EDS | - | <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Energia Dispersiva) |
| EL | - | Forças Eletrostáticas |
| HA | - | Hidroxiapatita |
| HIV | - | <i>Human immunodeficiency Virus</i> |
| HMDS | - | Hexametil disilano |

| | | |
|---|---|--|
| INTO | - | Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia |
| ISQ | - | Implant Stability Quotient (Coeficiente de Estabilidade do Implante) |
| kV | - | Quilovolt |
| LDMN Medula óssea) | - | <i>Low-Density Mononuclear</i> (Camada Mononuclear de Baixa Densidade da |
| LW | - | Forças de van der Waals |
| mm | - | Milímetro |
| MAPC | - | <i>Multipotent Adult Progenitor Cell</i> (Célula Progenitora Multipotente do Adulto) |
| Mq | - | Superfície maquinada |
| MSCs | - | <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (Células Tronco Mesenquimais) |
| MEV | - | Microscópio Eletrônico de Varredura |
| μl | - | Microlitro |
| μm | - | Micrometro |
| μM | - | Micromoles |
| μN | - | Micro Newtons |
| NIH América) | - | The National Institutes of Health (Ministério da Saúde dos Estados Unidos da |
| nm | - | Nanômetro |
| O ² | - | Oxigênio Livre |
| OC | - | Osteocalcina |
| -OH | - | Hidroxila |
| ON | - | Osteonectina |
| OPN | - | Osteopontina |
| <i>P</i> | - | Pressão |
| PBS | - | <i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Solução Tampão Salina de Fosfato) |
| PGE ₂ | - | Prostaglandina E ₂ |
| pH | - | Potencial Hidrogenionte |
| PMN | - | Polimorfos Nucleares Neutrófilos |
| PO ₄ ⁻ | - | Íon fosfato |
| PTH | - | Hormônio Paratireoidiano (Hormônio) |
| R _a | - | Rugosidade Média |
| RBCs | - | Red Blood Cells (Hemácias) |
| RNA _m | - | Ácido Ribonucléico Mensageiro |
| RP | - | <i>Rapid Prototype</i> (Prototipagem Rápida) |
| SLA de grana grossa e atacada por ácido) | - | <i>Sand-Blasted Large Grit Acid Etched</i> (Superfície jateada por grãos de areia |
| ST | - | Superfície tratada (tratamento superficial) |
| Θ | - | Ângulo de Contato |
| <i>T</i> | - | Temperatura |
| TEM | - | <i>Transmission Electron Microscope</i> (Microscópio Eletrônico de Transmissão) |
| TGF-β | - | <i>Transforming Growth Factor β</i> (fator de Crescimento β) |

- TGF- β 1 - *Transforming GrowingFactor β 1* (fator de Crescimento β 1)
- TGF- β 2 - *Transforming GrowingFactor β 2* (fator de Crescimento β 2)
- TiO₂ - Óxido de titânio
- TPS - *Titanium Plasma Spray* (Plasma Spray de Titânio)
- X - Aumento do número de vezes

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, p. 20

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 24

2.1 O TECIDO ÓSSEO, p. 25

2.1.1 A histologia e a fisiologia óssea, p. 25

2.1.1.1 A nutrição, p. 25

2.1.1.2 As células, p. 26

2.1.1.3 A matriz óssea, p. 30

2.1.1.4 A remodelação e a regeneração, p. 31

2.1.2 A osteogênese, p. 32

2.2 A BIOENGENHARIA – ENGENHARIA ÓSSEA , p. 34

2.2.1 Os biomateriais, p. 34

2.2.2 A energia superficial, o ângulo de contato e a molhabilidade, p. 38

2.2.3 O titânio e o óxido de titânio, p. 41

2.2.4 A interação célula-biomaterial, p. 42

2.2.5 A engenharia óssea e as possibilidades com os estudos das células-tronco e fatores osteogênicos da medula óssea, p. 46

2.2.5.1 As células-tronco, p. 46

2.2.5.2 Os fatores osteogênicos da medula óssea, p. 49

2.2.6 Os implantes dentários, p. 56

2.2.6.1 Aspectos relacionados às superfícies dos implantes dentários, p. 59

2.3 A OSSEOINTEGRAÇÃO, p. 64

2.4 INTERAÇÃO CÉLULA/BIOMATERIAL. A ADESÃO CELULAR AOS OSTEOINTEGRÁVEIS, p. 66

3 OBJETIVOS, p. 68

3.1 OBJETIVO GERAL, p. 69

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p. 69

4 HIPÓTESES, p. 70

5 MATERIAIS E MÉTODOS, p. 73

5.1 CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA, p. 74

5.1.1 **Corpos de prova**, p. 75

| | | |
|---------|--|--------|
| 5.1.1.1 | Análise da macro e microestrutura das superfícies, | p. 75 |
| 5.1.1.2 | Análise dos ângulos de contato (molhabilidade), | p. 75 |
| 5.1.1.3 | Análise da adesão, | p. 75 |
| 5.2 | ARMAZENAGEM, | p. 76 |
| 5.3 | ANÁLISE TOPOGRÁFICA E QUÍMICA DAS SUPERFÍCIES MAQUINADAS (Mq) E TRATADAS (ST), | p. 77 |
| 5.4 | MEDIÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO, | p. 77 |
| 5.5 | TESTE DE ADESÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS, | p. 79 |
| 5.5.1 | Obtenção de células do estroma da medula óssea humana, | p. 79 |
| 5.5.2 | Contagem de células, | p. 81 |
| 5.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA, | p. 83 |
| 5.6.1 | Rugosidade média (R_a), | p. 83 |
| 5.6.2 | Ângulo de contato, | p. 83 |
| 5.6.3 | Contagem de células, | p. 84 |
| 6 | RESULTADOS, | p. 85 |
| 6.1 | ANÁLISE MORFOLÓGICA E QUÍMICA DAS SUPERFÍCIES MAQUINADAS E TRATADAS, | p. 86 |
| 6.1.1 | Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS), | p. 86 |
| 6.1.2 | Perfilometria, | p. 89 |
| 6.2 | MEDIÇÃO DOS ÂNGULOS DE CONTATO, | p. 92 |
| 6.3 | TESTE DE ADESÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS, | p. 94 |
| 6.3.1 | Contagem de células, | p. 96 |
| 7 | DISCUSSÃO, | p. 98 |
| 8 | CONCLUSÕES, | p. 109 |
| 9 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, | p. 111 |
| | APÊNDICES, | p. 129 |
| | ANEXOS, | p. 136 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A perda de elementos dentários e as tentativas de reposição destes são desafios que fazem parte da própria história da humanidade (SPIEKERMANN et al., 1995).

A descoberta da osseointegração na segunda metade dos anos 60 por Per-Ingvar Brånemark, seguida por seus estudos preliminares; e posteriormente a sua consolidação na comunidade científica mundial, nos anos 80, através da divulgação na América do Norte com a Conferência de Toronto em 1982, a encargo de George Zarb (ALBREKTSSON e WENNERBERG, 2005), foi um divisor de águas entre passado e futuro.

Desde o início e até hoje a maioria dos implantes de titânio utilizados em todo o mundo são para reabilitações de pacientes edêntulos, porém o que se observa é que não há limites em suas possibilidades, tais como próteses faciais, auriculares, entre outras (BRÅNEMARK et al., 2001).

O protocolo original de Brånemark objetivava um período de “repouso” livre de cargas para que pudesse haver uma previsibilidade na área receptora de um implante de titânio (GAPSKI et al., 2003); paradigma que tem sido quebrado com as constantes pesquisas na área e geração de modelos atuais como o carregamento imediato (MEYER et al., 2003).

Entendimentos sobre a macro e a micro estrutura das superfícies, assim como o desenho (plataformas, roscas, e geometria em seu todo), mecânica, topografia e análise química das fixações (NIZNICK, 2000; GEURS et al., 2002; ALBREKTSSON e WENNERBERG 2004[a]) estão possibilitando resultados cada vez mais rápidos e previsíveis.

Carga imediata, função imediata ou carregamento precoce. Embora estas terminologias ainda não estejam bem definidas, suas propostas e princípios são bem

claros; reduzindo sensivelmente o tempo de trabalho e conseqüentemente a satisfação paciente/profissional.

Dentre os parâmetros para o carregamento precoce, uma estabilidade primária ótima tem sido relatada como primordial. Sendo obtida através do maior contato possível entre a fixação e o sítio ósseo (interface) (SAAD et al., 2007).

Em relação ao contato osso-implante, os fabricantes têm direcionado seus esforços na busca de uma superfície de implante ideal, que promova uma osseointegração rápida e duradoura (SAMMONS et al., 2005). Uma vez que, as interações células-titânio são fatores fundamentais para o sucesso clínico das fixações (SADER et al., 2005). A busca desta superfície está na necessidade do entendimento de qual a melhor resposta biomaterial-tecido. E a mais estudada atualmente é a de titânio comercialmente puro (cpTi), pois tem demonstrado excelentes resultados prospectivos em longo prazo (PLACKO et al., 2000), com uma taxa de sucesso na ordem de 87,5% a 97,4% (UEHARA; TAKAOKA; ITO, 2004).

Estudos comparativos têm avaliado o comportamento dos osteoblastos em contato com o titânio nos diversos tipos de tratamentos que as superfícies dos implantes vem recebendo. Tem sido demonstrando que a rugosidade parece otimizar a mineralização da matriz óssea (BOYAN et al., 2003), e que as superfícies lisas necessitam de um maior tempo para que ocorra a osseointegração (BOTTICELLI et al, 2005).

Algumas respostas aos freqüentes questionamentos e possibilidade de tornar ainda mais efetivas as superfícies dos implantes ósteo-integráveis estão sendo obtidas pela compreensão dos fenômenos de interfaces. Conhecimentos sobre as diversas topografias através de técnicas de magnificação avançadas e mapeamento superficial tem sido de grande relevância no entendimento do comportamento das células sobre os diversos tipos de fixações (SADER et al., 2005). O estudo da molhabilidade e, por conseguinte da energia superficial também tem servido de grande auxílio a este propósito. Estes têm demonstrado a relevância da hidrofília do titânio. Segundo BUSER et al (2004); RUPP et al. (2006), a rugosidade tende a aumentar a energia de superfície e conseqüentemente a molhabilidade, promovendo uma maior capacidade hidrofílica dos implantes dentários; fator relevante em relação ao micro ambiente ósseo. E sendo o fenômeno da adesão o primeiro a ocorrer após o contato bio-sistema/biomaterial, onde as células deverão aderir a uma superfície que mimetize da melhor forma possível o micro ambiente ósseo (SCHWARTZ, Z. et

al., 1999), a utilização de culturas de células quando correlacionadas às ferramentas anteriormente citadas, tendem a obter resultados cada vez mais próximos do real. Sendo assim, estudos que possibilitem o conhecimento dos mais diversos sistemas de implantes, desde a sua manufatura, até o seu comportamento final frente ao vivo, são de extrema relevância para que estes artefatos cumpram suas funções dentro dos preceitos de biocompatibilidade e biossegurança.

O objetivo do presente estudo é a análise física, química e biológica de superfícies de titânio maquinadas (Mq) e com tratamento superficial (ST) utilizadas em implantes osteointegráveis de uso odontológico (fixações) através da microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de energia dispersiva, perfilometria, ângulos de contato e adesão de células do estroma da medula óssea humana.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido conjuntivo especializado (ALBERTS et al., 1997), ricamente vascularizado, com uma intrincada organização celular (HING, 2004; STEVENS et al., 2005) e responsável pela maior parte do esqueleto.

Tem uma ampla função de resistência mecânica, sustentação dos músculos, proteção dos órgãos, formação hematopoiética e reserva de cálcio para o corpo (BLAIR; ZAIDI; SCHLESINGER, 2002; KAPANEN, 2002; DUMPLOMB et al., 2006).

2.1.1 A histologia e a fisiologia óssea

2.1.1.1 A nutrição

Em uma visão macroscópica o tecido ósseo será dividido didaticamente em osso cortical e medular (HING, 2004), e é revestido interna e externamente por membranas ricas em células com características fibroblásticas (McKIBBIN, 1978) denominadas respectivamente endóstio e perióstio (figura1). A função destas membranas está relacionada à proteção celular e a manutenção da vitalidade do tecido em questão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1973).

A nutrição é dada através dos vasos sanguíneos, que serão observados superficialmente ao perióstio, endóstio e trabéculas medulares. Nestas regiões as células ósseas se alinham paralelas a estes vasos. O osso compacto ou cortical terá um sistema vascular denominado Harversiano (canais de Harvers), especializado em áreas mais profundas (McKIBBIN, 1978); a interligação dos canais de Harvers ocorrerá pelo sistema colateral de Volkmann, ou canais de Volkmann (figura 1) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1973).

A manutenção tecidual é dada de forma dinâmica e harmônica através das células (GOLDHABER, 1966; CHEN et al., 1997; BLAIR, 2002), que irão comandar um processo de aposição e reabsorção (remodelação) através de mecanismos precisos (*turnover ósseo*) (*Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues, Ciba Foundation Symposium*, 1988, apud ALBERTS et al, 1997; BLAIR; ZAIDI; SCHLESINGER, 2002).

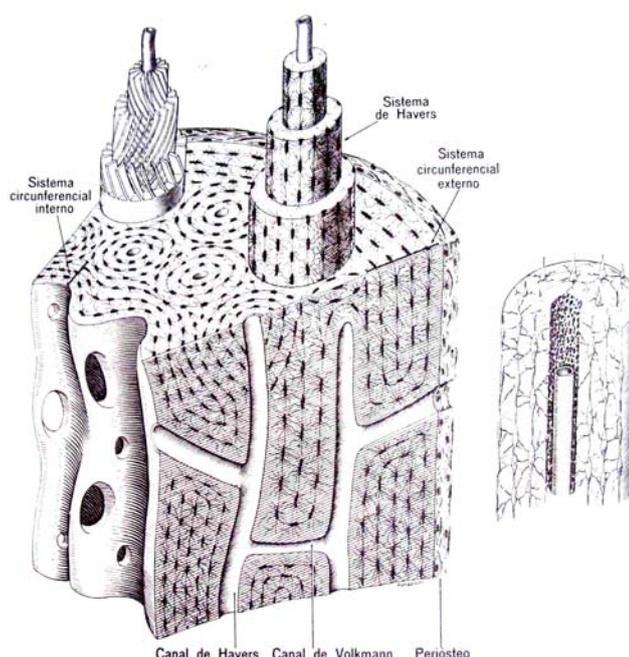


Figura 1 – Esquema macroscópico da estrutura da diáfise em ossos longos. É observado o sistema Harversiano e canais colaterais de Volkmann, responsáveis pela facilitação da vascularização óssea, e a presença do sistema circunferencial, provido de lamelas concêntricas, onde os osteócitos são organizados preenchendo as lacunas e interligando-se entre si para a manutenção da nutrição. A direita um sistema de Harvers isolado mostrando a organização dos osteócitos margeando o vaso sanguíneo.

Fonte: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo In JUNQUEIRA,L.C. e CARNEIRO,J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A. Cap.8, p.132-155, 1973.

2.1.1.2 As células

Os componentes celulares do tecido ósseo são: os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos.

Os osteoblastos são as células responsáveis pela formação e renovação da matriz óssea através da síntese e deposição desta (KAABECHE et al. 2004) em

períodos distintos e pela expressão de genes específicos (DUCY et al. 1999; SCHWARTZ et al, 1999; BECK Jr; ZELER; MORAN, 2000; D'ALONZO et al., 2002). Este tipo celular se especializa através da modulação e não pela mitose, como as células osteoprogenitoras e células pluripotentes do estroma da medula óssea, as quais lhe darão origem (CHIAPASCO; ROSSI, 2007). Tem a função de estruturar o esqueleto e mantê-lo com da deposição de matriz óssea não mineralizada (osteóide) e minerais. Sendo então o osteoblasto responsável pela produção de colágeno, fosfatase alcalina (ALP), osteonectina (ON), osteocalcina (OC), osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP), prostaglandina E₂, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fosfoproteínas, colagenase e estimuladores do plasminogênio (GANONG et al., 1989; CHEN et al., 1997; SCHWARTZ et al., 1999; PURPURA; AUBIN; ZANDSTRA, 2004; CHIAPASCO; ROSSI, 2007). Sua organização no tecido ósseo se dá através de unidades multicelulares (BMUs), unidas através de *gap junctions*, denominadas osteons. Estas unidades irão atuar em conjunto na formação da estrutura compósita (BLAIR; ZAIDI; SCHLESINGER, 2002; BOSKEY; PASCHALIS, 2005).

Estudos suportam que a origem dos osteoblastos esteja no estroma da medula óssea a partir das células-tronco mesenquimais (BALDUÍNO, 2006). Onde estas deverão se diferenciar inicialmente em pré-osteoblastos (célula osteoprogenitora) e em seguida no tipo celular em questão através da expressão dos fatores de crescimento β (TGF- β 1 e TGF- β 2) que fazem parte de uma superfamília, onde são também encontradas as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) (NODA; CAMILLIERE, 1989; SCHWARTZ et al., 1999; BLAIR; ZAIDI; SCHLESINGER, 2002; CHIAPASCO; ROSSI, 2007). Os fatotes TGF- β 1 e TGF- β 2 serão sintetizados nas plaquetas, macrófagos e até nos próprios osteoblastos (CHIAPASCO; ROSSI, 2007).

Após a sua diferenciação os osteoblastos darão início à produção da matriz não mineralizada (SCHNEIDER, 2003), tomando uma forma cuboidal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1973) ou poligonal, onde serão notados prolongamentos celulares e citoplasma basófilo; o núcleo apresentará então uma localização excêntrica e o nucléolo tornar-se-á proeminente (SCHWARTZ et al. 1999). Sua ultra-estrutura apresenta um abundante retículo endoplasmático rugoso e grande quantidade de lamelas do complexo de Golgi que são responsáveis pela síntese e processamento da matriz óssea. São ainda encontradas numerosas mitocôndrias e grande quantidade de vesículas secretoras (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1973),

caracterizando-se então esta célula como sintetizadora de proteínas (DUMPLOMB et al., 2006). Os prolongamentos celulares funcionam como área de união entre os osteoblastos vizinhos, e tornam-se mais evidentes quando estes são aprisionados na matriz óssea. Sendo utilizados na comunicação entre os agora então, osteócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1973); e destes com as células de revestimento ósseo e vasos sanguíneos (SCHWARTZ et al. 1999). As células de revestimento ósseo (*bone lining cells*) têm forma achatada devido ao pequeno poder de síntese, e parecem derivar dos osteoblastos após a finalização da mineralização da matriz colágena. Sugere-se que estes elementos celulares possam ser mantidos na superfície do tecido após a síntese desta ao invés de serem incorporados ao processo de mineralização (SCHWARTZ et al., 1999; CHIAPASCO; ROSSI, 2007). Estas células deverão permanecer assim até que uma nova remodelação se inicie ou então voltem à fase de célula indiferenciada (MUSCHLER; MIDURA; NAKAMOTO, 2003).

Os mecanismos que controlam a aposição da matriz colágena e diferenciação dos osteoblastos após o nascimento ainda são pouco conhecidos. Supõem-se que a mineralização ocorra através da interação matriz extracelular/osteoblasto (D'ALONZO et al., 2002).

Atualmente sabe-se que o fator de transcrição genética *Cbfa-1* (*Core binding factor-1*) parece ser expresso na fase de diferenciação do osteoblasto por ativação seqüencial. A expressão do *Cbfa-1* regula a produção da osteocalcina (proteína não colagênica) que juntamente com a osteonectina (proteína não colagênica) irão funcionar como fatores ligantes do cálcio e induzir a calcificação da matriz (DUCY et al. 1999). Sendo assim, o fator *Cbfa-1* é considerado o primeiro marcador específico da osteogênese, uma vez que este só é expresso em osteoblastos e condroblastos.

O osteoblasto é responsável pela síntese de vários tipos de colágeno (Tipos I, III, IV e V), sendo que o Colágeno Tipo I é responsável por cerca de 97% do colágeno total sintetizado pelos osteoblastos. (BOSKEY; PASCHALIS, 2005). Dados recentes (BALDUÍNO, 2006) levantam a hipótese de que este tipo celular seja responsável também pela manutenção das células-tronco hematopoiéticas através de fatores que induzem a auto-renovação, controle da quiescência e manutenção da forma tronco.

A atuação dos osteoblastos assim como os demais tipos celulares é dada através da adesão da célula em vários fenômenos biológicos, desde a

embriogênese, manutenção tecidual, processos cicatriciais, respostas imunológicas, metástases e até a própria integração aos biomateriais. Sendo assim, as características das superfícies dos biomateriais como topografia, química e energia superficial livre são essenciais para que a resposta celular seja favorável (ANSELME, 2000).

Os osteoclastos são células multinucleadas responsáveis pela reabsorção tecidual e são encontradas em depressões da matriz óssea denominadas lacunas de Howship (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1973). Segundo GANONG (1989); YAMATE et al (1997); BLAIR; ZAIDI; SCHLESINGER (2002), estes tipos celulares são derivados dos monócitos sanguíneos, e responsáveis pela reabsorção da matriz no processo de remodelação óssea. Todavia, TAICHMAN; EMERSON (1998), CHIAPASCO; ROSSI (2007) observam que não há consenso sobre a linhagem osteoclástica ser oriunda de monócitos/macrófagos ou da fusão de precursores dos monócitos (monoblastos).

A atividade osteoclástica em osso intacto se dará através de estímulos recebidos pelo hormônio para-tireoideano, prostaglandinas e 1,25 dihidroxi-vitamina D₃. Sugere-se que o comportamento destas células possa estar ainda associado à atividade hormonal de outro tipo celular; e que a célula candidata seria o osteoblasto.

O possível mecanismo pelo qual os osteoblastos possam ativar a osteoclase pode ser descrito através da exposição de minerais pelos osteoblastos ao produzirem colagenase e o ativador tecidual do plasminogênio (CHAMBERS; DARBY; FULLER, 1985; DUMPLOMB et al., 2006).

Após intensa produção de matriz os osteoblastos, como já citado, são aprisionados por esta e transformam-se em osteócitos, posicionando-se em regiões mais internas denominadas lacunas. Estas células têm um poder de síntese bem reduzido, mas são de alta relevância para a vitalidade óssea e atuantes no processo de homeostase. Após sua apoptose a matriz do local é imediatamente reabsorvida (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1973; CHIAPASCO; ROSSI, 2007) iniciando-se um novo ciclo de remodelação.

2.1.1.3 A matriz óssea

A excelência mecânica do tecido ósseo, estudada de forma bem ampla (FROST, 1990; FROST, 1991; FROST, 1994; WISKOTT; BELSER, 1999; BUCHMAN, 2003), se dá através de sua matriz, formada predominantemente por colágeno tipo I, que promove uma grande resistência à tração, e fosfato de cálcio na forma de cristais de hidroxiapatita ($(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$), que aumentam a rigidez e resistência à compressão (*Cell and Molecullear Biology of Vertebrate Hard Tissues, Ciba Foundation Symposium, 1988, apud ALBERTS et al, 1997*). O colágeno juntamente com as proteínas não colágenas (fosfoproteínas, proteínas gama carboxiladas, proteoglicanas e proteolipídeos) e fatores de crescimento são responsáveis pela porção orgânica desta matriz (25%). E a hidroxiapatita (HA) pela inorgânica (60%), restando ainda cerca de 15% de água (BOSKEY; PASCHALIS, 2005). Dentre as proteínas não colágenas, segundo HING (2004), as de maior interesse são a osteocalcina (OC), sialoproteína óssea (BSP), osteopontina (OPN) e osteonectina (ON) por se acreditar que estas são as responsáveis pelo controle e manutenção da matriz. Sendo somente a OC e BSP específicas do osso. As funções destas proteínas, segundo uma revisão realizada por este autor são:

A OC é a mais abundante proteína gama-carboxilada encontrada na matriz extracelular e altamente ligante da hidroxiapatita, mas não ao fosfato de cálcio amorfo.

A BSP é uma sialoglicoproteína acidificada e compreende cerca de 15% das proteínas não colágenas da matriz. Acredita-se que esteja associada à mineralização e remodelação óssea. Esta proteína apresenta uma atividade multifuncional (dose dependente) tanto para a diferenciação dos osteoblastos como para a reabsorção da matriz óssea.

A OPN é uma glicoproteína fosforilada acidificada presente em vários tecidos, possui grande importância na inibição da formação de HA, diminuindo a possibilidade de calcificações ectópicas.

Em relação à ON há algumas controvérsias, enquanto TERMINE et al (1981), observaram que esta fosfoproteína parece ser uma das responsáveis na iniciação do processo de mineralização através da promoção de nódulos de calcificação do colágeno. Dados corroborados por DUCY et al. (1999). HING (2004) comenta que esta é a proteína sintetizada pelos osteoblastos com a menor concentração na

matriz óssea, tendo maior presença em outros tecidos. E que por este motivo a sua importância na formação óssea seria especulativa. Este autor sugere que ela estaria ligada à inibição da formação de HA, porém somente quando esta se apresenta em grandes concentrações. E acreditam que esteja mais associada às interações celulares como modificação da forma dos osteoblastos, do que da própria mineralização da matriz.

Os fatores de crescimento são peptídeos que irão regular o crescimento, função e motilidade, resultando na formação do tecido em questão (HING, 2004).

2.1.1.4 A remodelação e a regeneração

A manutenção e renovação tecidual é dada através da remodelação. Este evento também é reativado em casos onde há perda de continuidade, como por exemplo em fraturas. (McKIBBIN, 1978).

O processo de remodelação se inicia com um grupo de aproximadamente 6 a 10 osteoclastos reabsorvendo diariamente uma média de 20-40 μm de matriz na forma linear por um processo de acidificação ($\text{pH} \approx 5.0$) mediado por enzimas (anidrase carbônica e proteases) (CHIAPASCO; ROSSI, 2007). A reabsorção se dará por volta de até 100 dias, sendo seguida pela deposição de matriz pelos osteoblastos. Nas áreas de remodelação são observadas as denominadas “cunhas de corte” onde se notam erosões provocadas pelos osteoclastos denominadas “cones de reabsorção” (figura 2).

A deposição da matriz óssea que promoverá a renovação do tecido ósseo no adulto se dará através de unidades básicas multicelulares (BMUs), compostas por osteoblastos unidos através de *gap junctions*. Estima-se que cada BMU chegue a ter em média 2000 osteoblastos ativos. O número de BMUs por área dependerá da solicitação ao osso em questão. A aposição de matriz óssea ocorre até uma média de até 225 μm^3 por osteoblasto por dia, por um período médio de até 50 dias. (MUSCHLER; MIDURA; NAKAMOTO, 2003).

Devido ao intenso metabolismo do processo citado, o *turnover* ósseo ocorre com uma produção de matriz acima na necessária, onde sobra uma boa margem de segurança para a sobrevivência do tecido (BLAIR; ZAIDI; SCHLESINGER, 2002; MUSCHLER; MIDURA; NAKAMOTO, 2003).

Quando ocorrem fraturas ósseas a reconstituição se dará através da reativação de processos característicos da fase de embriogênese. Entretanto, devido às baixas concentrações de oxigênio o que ocorrerá neste momento serão fenômenos de ossificação endocondral onde a formação óssea é realizada por substituição de um molde de tecido cartilaginoso (HING, 2004).

Logo após perda da integridade ocorrerá a formação do coágulo sanguíneo que preencherá os espaços entre os fragmentos ósseos (McKIBBIN, 1978). Neste momento células inflamatórias migrarão para a área, liberando mediadores químicos e fatores de crescimento que serão capazes de reativar as células osteoprogenitoras (SCHWARTZ et al. 1999). Através da estabilização e imobilização da fratura ocorrerá a facilitação da vascularização proporcionando a diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos. A vascularização é vital na manutenção do osteoblasto, pois irá carrear e aumentar a tensão de oxigênio na área, fator extremamente importante na síntese da matriz óssea (McKIBBIN, 1978), uma vez que a ruptura inicial do tecido levará este a situações de necrose (HING, 2004).

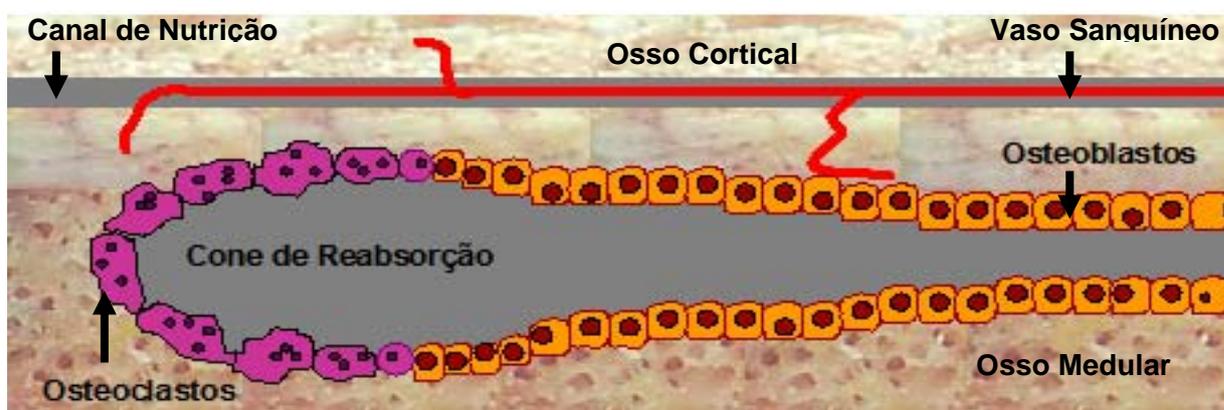


Figura 2 – Cunha de corte. Mecanismo da remodelação óssea . Os osteoclastos promovem a reabsorção da matriz óssea. Neste momento é observada uma erosão no tecido denominada cone de reabsorção. Logo em seguida uma unidade básica multicelular (BMU), composta por um grupo de osteoblastos ativos unidos através de *gap junctions* acompanha esta erosão depositando matriz osteoide para a renovação tecidual (mineralização).

2.1.2 A osteogênese

A osteogênese é um processo complexo que envolve a diferenciação de células mesenquimais pluripotentes em pré-osteoblastos e posteriormente em

osteoblastos. Este desenrolar celular se repetirá ainda durante a remodelação óssea fisiológica ou em fraturas (MURAGLIA; CANCEDDA; QUARTO, 2000; HING, 2004).

Este processo é dividido em dois tipos de ossificação, intramembranosa e endocondral. Onde a primeira ocorrerá através de células embrionárias totipotentes, diferenciando-se em osteoblastos com conseqüente formação de tecido ósseo. E a segunda através da substituição de um molde de tecido cartilaginoso por células ósseas, como citado anteriormente (HING, 2004).

O entendimento dos períodos da osteogênese se dará através de mecanismos de balanço e manutenção da matriz óssea (BLAIR; ZAIDI.; SCHLESINGER, 2002). Como resumo podem ser citados quatro períodos distintos:

Período I : Proliferação das células osteoblásticas e síntese do colágeno tipo I :

Nesta fase as células mesenquimais pluripotentes tendem a diferenciarem-se em osteoblastos através da expressão genética do fator de crescimento TGF- β (NODA; CAMILLIERE, 1989). Esta diferenciação depende da adesão das células sobre as moléculas de proteínas da matriz como o Colágeno Tipo I e fibronectina por atuação de glicoproteínas extracelulares denominadas integrinas (α e β) (KAABECHE et al. 2004).

Período II : Expressão genética para a maturação da matriz óssea:

Após a fase inicial tem início a expressão dos genes responsáveis pela organização da matriz. A matriz osteóide é invadida por vesículas extracelulares ricas em fosfatase alcalina (ALP), um dos fatores relacionados com a proliferação e calcificação (POSTIGLIONE et al., 2003; GÜRPINAR; ONUR, 2005).

Período III : Mineralização da matriz:

Nesta fase a expressão genética será em direção à deposição de cristais de hidroxiapatita para a calcificação da matriz (BECK Jr; ZELER; MORAN, 2000). Há grande produção de osteocalcina (OC) e osteopontina (OPN), duas proteínas não colágenas, responsáveis pela modulação das ligações de íons cálcio (DUCY et al. 1999) e grande afinidade pela hidroxiapatita (MERRY et al., 1993). A produção de OPN parece ter ligação como o aumento da ALP que atua como sinalizadora através de íons fosfato liberados no meio (BECK Jr; ZELER; MORAN, 2000).

Período VI : Finalização:

A matriz recebe grande quantidade de colágeno tipo I e colagenase-3 para modelação tecidual. A expressão da colagenase-3 dependerá da síntese da matriz colágena (D'ÁLONZO et al., 2002).

O processo de aposição e reabsorção da matriz óssea ocorre durante toda a vida e desta maneira é renovada e mantida a integridade do tecido ósseo.

O osso é o único tecido que, em vertebrados terá a condição de regenerar-se. Os demais tecidos como cardíaco, muscular e nervoso serão reparados por fibroses (HING, 2004).

2.2 A BIOENGENHARIA – ENGENHARIA ÓSSEA

A engenharia tecidual começou em 1933, quando Bisceglie cultivou células tumorais de ratos em uma membrana de polímero e transplantou ao peritônio de um embrião de galinha. Esta tecnologia veio possibilitar a regeneração ou substituição de várias partes de órgãos e sistemas através de medidas biológicas (GARNER, 2002).

Avanços nesta área, através dos biomateriais, tem trazido um grande impacto na restauração e reabilitação de estruturas teciduais perdidas do corpo humano (BRUNSKI; PULEO; NANCI, 2000; XIONG et al., 2002; GARNER, 2002; REKOW, 2003; LIM; DONAHUE, 2004; STEVENS et al., 2005; KENNEDY, et al., 2006).

2.2.1 Os biomateriais

Biomateriais são conceituados como materiais capazes de substituir estruturas perdidas, promover um aumento de uma estrutura pré-existente ou até mesmo induzirem a formação de um novo tecido (BURG; PORTER; KELLAM, 2000; LIM; DONAHUE, 2004). MUSCHLER; NAKAMOTO; GRIFFITH (2004) , acrescentam ainda que tudo isto é possível através de conhecimentos adquiridos em áreas da física, da química e da biologia dentro de práticas clínicas efetivas com materiais, dispositivos e sistemas específicos, baseados em uma estratégia pré-concebida.

O contato do biomaterial com o tecido vivo através da interface irá influenciar uma resposta celular/tecidual, ativando assim o mecanismo desejado e obtendo resultados precisos (BRUNSKI; PULEO; NANCI, 2000; LIM; DONAHUE, 2004;

MEYER et al. 2005). Chama-se isto de biossegurança e biocompatibilidade; qualidades requeridas a um biomaterial (KUMARI et al, 2002).

Estes conhecimentos tem levado a excelentes resultados em engenharia óssea. Exaustivos estudos vem sendo desenvolvidos com o objetivo da reconstrução do esqueleto. Sugere-se a importância de de três elementos básicos neste sentido, que são: as células, os fatores de crescimento e um arcabouço osteogênico e/ou osteocondutor / osteopromotor (HING, 2004).

A utilização de arcabouços absorvíveis têm se tornado o grande “gol” em técnicas de reconstrução, servindo como matrizes tridimensionais para o desenrolar celular (XIONG et al., 2002).

STEVENS et al. (2005), sugerem que sejam chamados de “bio-reatores ósseos” as novas metodologias de estimulação tecidual para áreas extensas. E sugerem que estes “promotores” de células têm o grande benefício de diminuir a morbidade cirúrgica. Em seus estudos demonstraram a possibilidade de reconstruções através da utilização de estimuladores celulares em regiões providas de grande atividade pluripotencial (bio-reator). Estes estimuladores seriam “grandes meios de cultura” utilizados *in vivo*. Seus resultados foram bastante satisfatórios.

A procura constante de biomateriais que promovam uma interação e formação óssea excelente ainda é necessária, pois perduram diversas perguntas sem respostas em relação à a engenharia tecidual e a atividade das células-tronco (BURG; PORTER; KELLAM, 2000; KUMARI et al., 2002; LIM; DONAHUE, 2004).

Por definição, células-tronco são aquelas que tem o poder de auto-renovação e capacidade de diferenciarem-se em pelo menos um tipo celular maduro (HERZOG; KRAUSE, 2003). Talvez devido a estes motivos, as terapias baseadas na utilização de células-tronco em desordens degenerativas e demais tipos de injúrias tenham tomado corpo no atual momento científico.

Células mesenquimais pluripotentes originárias da medula óssea são facilmente cultivadas mantendo a sua linhagem (DAGA, 2002; SHU LEE et al., 2003; MATTIOLLI-BELMONTE et al., 2005), e possuem alta plasticidade, podendo se diferenciar em células de vários tecidos (HERZOG; KRAUSE, 2003) o que as tornam especialmente interessantes em engenharia óssea.

Células estromais da medula óssea (BMSCs) têm sido utilizadas com a proposição de suporte hematopoiético em transplantes e terapias genéticas. Todavia a infusão sistêmica não tem trazido resultados longitudinais tão relevantes como os

transplantes subcutâneos. Este tipo de modalidade vem elevando a aproximadamente cerca de 70% o hematócrito por até 2 meses em média (DAGA et al, 2002).

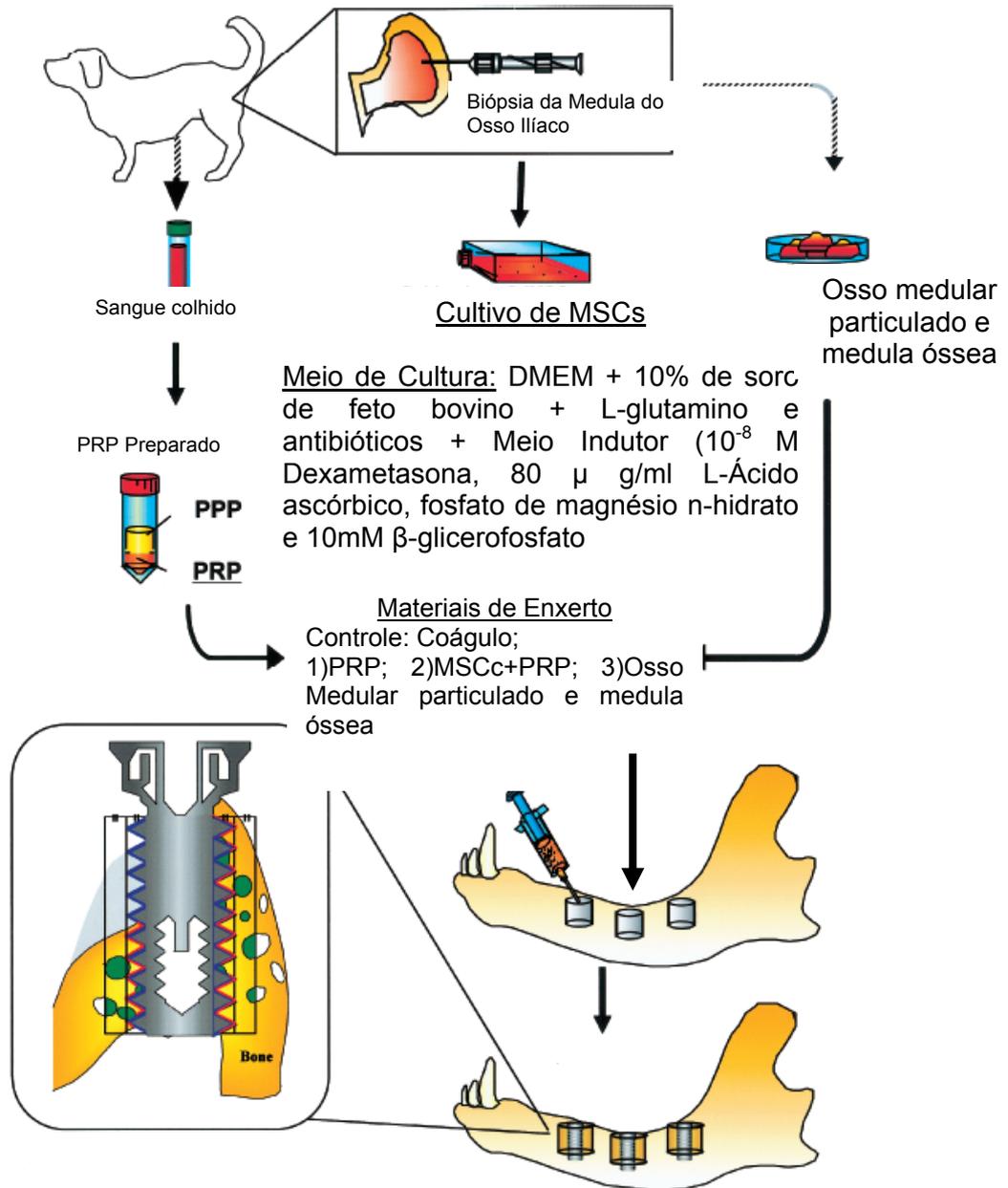


Figura 3 – Regeneração tecidual baseada em princípios de bioengenharia. A utilização de plasma rico em plaquetas (PRP), adicionado a células do estroma medular, obtidas através de meios de cultura, adicionadas a osso medular particulado, parecem promover a regeneração óssea.

FONTE: YAMADA, Y. et al. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Impl Res*, v.15, p.589-597, 2004.

MUSCHLER, NAKAMOTO, GRIFFITH (2004), observam que as novas tendências de uso de células-tronco em bioengenharia são:

Implantes de receptores de células progenitoras (arcabouços);

Transplante de células progenitoras para aumento do volume destas no local;

Transplante de culturas expandidas de células progenitoras;

Transplante total de tecido neo-formado.

YAMADA et al. (2004) demonstraram ser possível promover a regeneração óssea em defeitos provocados com a utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) associado a células mesenquimais pluripotentes originárias da medula óssea transplantadas diretamente sobre o local do defeito, beneficiando assim a neo formação óssea viabilizando a instalação de implantes osseointegrados (figura 3).

Todos os benefícios gerados pela bioengenharia tem melhorado sensivelmente os resultados nas mais diversas áreas da medicina.

Novas técnicas de enxertias e manipulação de tecidos vem conseguindo bons resultados, onde a odontologia tem sido altamente beneficiada. Dentre os biomateriais o titânio é um metal largamente utilizado na confecção de implantes dentários (CHIAPASCO; ROSSI, 2007), o qual tem obtido bons resultados longitudinais (UEHARA; TAKAOKA; ITO, 2004).

Embora já consagrada de forma clínica e científica, um grande número de estudos ainda têm sido direcionados para o entendimento completo do fenômeno da osseointegração. Especial atenção tem sido dada em relação à interface e interação dos osteoblastos com os implantes dentários (ALBREKTSSON; JACOBSSON, 1987; SCHNEIDER et al. , 2003).

A adesão, assim como nos tecidos corporais é a primeira fase de integração celular ao biomaterial. É importante saber que após o contato da célula com a superfície ocorrerão interações físico-químicas, onde estarão envolvidas forças iônicas, forças de van der Waals entre outras. Dando assim seqüência ao desenrolar do processo. Os eventos subseqüentes se desenvolverão através de atividades moleculares como os das proteínas da matriz extracelular, da membrana citoplasmática e do citoesqueleto que deverão interagir como sinalizadores para a transcrição dos fatores genéticos (ANSELME, 2000) e estão diretamente ligados à qualidade da superfície a ser colonizada (LIM; DONAHUE, 2004; MEYER et al., 2005; MATTIOLLI-BELMONTE et al., 2005).

O implante ideal, deve-se concluir, assim como todo e qualquer biomaterial, funcionará de forma a produzir uma previsível, controlada e rápida resposta tecidual na interface, alcançando uma estabilidade duradoura nos tecidos moles e duros (BRUNSKI; PULEO; NANJI, 2000).

LIM; DONAHUE (2004); RUPP et al. (2006), classificam a energia de superfície e molhabilidade como características de extrema importância aos biomateriais; e assim aos implantes dentários. Estes funcionarão em contato com meios líquidos onde a hidrofobicidade se faz absoluta, e dependem diretamente destes fatores para a fase inicial de “bio-integração”.

2.2.2 A energia superficial, o ângulo de contato e a molhabilidade

Superfícies imersas em meios líquidos estão sujeitas as forças não covalentes. São elas as forças de van der Waals (LW), as forças eletrostáticas (EL) e as forças ácido-base de Lewis (AB) (VAN OSS; GIESE; DOCOSLIS, 2001).

A água possui propriedades polares que causam fortes interações através das pontes de hidrogênio, que são um subgrupo das AB. Estas podem representar cerca de 90% de todas as interações biológicas do meio aquoso, podendo ser repulsivas ou atrativas. O estudo da tensão superficial em meios fluidos como a boca ou mesmo o sangue depende da determinação separada de LW, EL e AB (VAN OSS; GIESE; DOCOSLIS, 2001). Através do estudo destas forças pode-se determinar em grande parte a adesão de substâncias, sejam elas biológicas ou não, sobre as superfícies. Em odontologia isto se faz importante devido à energia de superfície dos materiais, que pode ser um dos determinantes na estabilidade e durabilidade destes sob condições adversas. O entendimento atômico dos materiais pode levar ao desenvolvimento de restaurações (biomateriais) com efeitos antibacterianos, por exemplo, (SATO et al. 1998).

A tensão superficial e a energia superficial livre estão relacionadas ao ângulo de contato. Segundo a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) em seu Compêndio de Terminologia Química / versão On-line a definição para ângulo de contato (figura 4) é:

“ Ângulo de Contato-: Quando um líquido não tem a capacidade de se espalhar sobre um substrato (usualmente um sólido), um ângulo de contato (Θ) é formado, o qual é definido como o ângulo formado pela tangente entre

duas interfaces em uma linha trifásica de contato. Deve-se sempre ser declarado que as interfaces determinarão o Θ . Se, todavia for necessário distinguir entre um ‘ângulo de contato avançado’ (Θ_a), um ‘ângulo de contato retrocedido’ (Θ_r) e o ‘ângulo de contato de equilíbrio’ (Θ_e), o sistema é dito como tendo um ângulo de contato em histerese.” (McNAUGHT; WILKINSON, 1997).

Átomos e moléculas têm uma tendência à movimentação através da energia cinética. Sendo que este movimento tende a ser decrescente do estado gasoso ao sólido. As moléculas livres por sua natureza tendem a aproximarem-se das vizinhas através da coesão. Nos sólidos a energia cinética é nula, devido à atração pelas forças de coesão na superfície. Denomina-se energia superficial o campo eletrostático que tende a manter esta união e a atrair as moléculas com campos elétricos contrários. Corpos cristalinos possuem alta energia superficial, assim como os de natureza metálica (STEENBECKER, 2003).

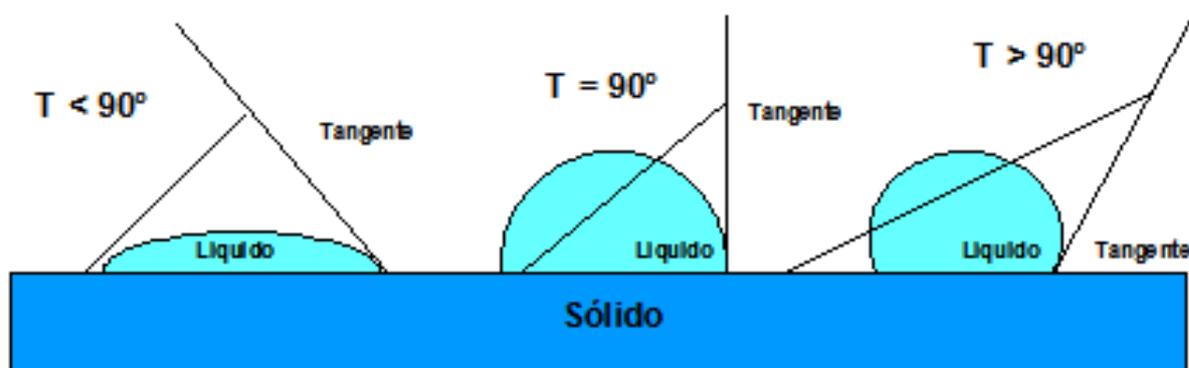


Figura 4 – Ângulo de Contato. Quando um líquido não tem a capacidade de se espalhar sobre um substrato (usualmente um sólido), um ângulo de contato (Θ) é formado, o qual é definido como o ângulo formado pela tangente entre duas interfaces em uma linha trifásica de contato (sólido/líquido líquido/ar e sólido/ar).

REUTER; SCHEFFLER (2001) definem a energia superficial livre de Gibbs como sendo o potencial termodinâmico de superfícies expostas ao oxigênio atmosférico, descrito como pressão de oxigênio (p) e temperatura (T).

Este seria o ambiente onde o oxigênio poderia ser absorvido ou doado sem a mudança de pressão ou temperatura.

A relação entre o ângulo de contato e a energia superficial livre ocorre de forma inversa em uma mesma superfície. Uma diminuição no ângulo de contato ocorre com o aumento da energia superficial livre. Em consequência deste fato a capacidade de molhabilidade da superfície torna-se maior (GALAN JR, 1999; LIM; DONAHUE, 2004).

Molhabilidade é o primeiro conceito em relação à atividade celular em um biomaterial. Define-se como sendo a capacidade de um líquido molhar uma superfície (LIM; DONAHUE, 2004).

O diagrama da morfologia da molhabilidade de cada substrato irá depender basicamente do tipo, forma dos sulcos da superfície e do ângulo de contato do material (SEEMANN et al, 2005). Diferenças na umidade do ambiente, rugosidade e química das superfícies podem separadas ou em conjunto contribuir para discrepâncias significativas.

O estudo da energia superficial se faz então muito importante para o entendimento da molhabilidade. Em tecido vivo, como o osso, tem-se observado que tanto a hidrofiliabilidade como a hidrofobicidade influenciam de forma marcante o comportamento celular (KENNEDY et al., 2006).

Após o tratamento superficial do titânio, nota-se que este se mostrará inicialmente hidrofóbico, porém após um pequeno espaço de tempo esta superfície tenderá a tornar-se hidrofílica. Esta hidrofobicidade inicial sugere-se, é devida a presença de moléculas de ar contidas após o jateamento do metal, por exemplo (RUPP et al. 2006).

Neste momento há que diferenciar energia superficial (sólidos) e tensão superficial (líquidos). Embora ambas possam ser expressas por J/m^2 (energia) ou N/m (mecânica). Por exemplo, substratos hidrofílicos são aqueles que têm alta energia de superfície e tendem a ser molhados através da baixa tensão superficial de determinados líquidos como a água (LIM; DONAHUE, 2004). Todavia a viscosidade dos líquidos e rugosidade de superfícies tendem a alterar a molhabilidade (VOGLER, 1999).

Em uma escala atômica não há como determinar a energia superficial de um material devido à oscilação freqüente, principalmente em ambientes reativos. Como exemplo, um mesmo metal pode ter diferentes composições químicas no seu todo, o que torna a sua energia superficial também diferente. Mesmo superfícies estáveis

podem tornar-se instáveis ao terem seu meio ambiente modificado (KASEMO; LAUSMAA, 1994; ORSINI et al., 2000).

A energia superficial tem sido utilizada em grande escala para avaliar interações células-materiais, assim como adesão, resistência de adesão, morfologia, espraiamento, proliferação e diferenciação. Os resultados muitas vezes têm sido contraditórios. Talvez pelos tipos celulares, tipos de métodos, tipos de culturas entre outros (BOYAN et al., 2003; KENNEDY et al., 2006).

2.2.3 O titânio e o óxido de titânio

O titânio é um metal reativo e quando exposto ao meio ambiente (ar e água) sofre atuação do oxigênio (KASEMO.; LAUSMAA, 1994). Durante a instalação de implantes osseointegrados é observada uma fina camada hidratada e estável de óxido (KASEMO; LAUSMAA, 1994) com aproximadamente 4-5 nm sobre o metal. Normalmente esta camada é encontrada na forma de óxido de titânio (TiO₂) (RUPP et al. 2006). Em suas regiões mais superficiais serão encontrados radicais hidroxila (-OH) e oxigênio livre (O²) (ZHAO et al, 2005). Em teoria as altas energias das superfícies de titânio tornam facilitada a obtenção da camada de óxido (ZHAO et al, 2005). Embora estável, após a formação desta ocorre uma diminuição da energia superficial (RUPP et al. 2006) devido a contaminação por hidrocarbonetos presentes no ar. Estudos com superfícies otimizadas em ambientes hidratados tendem a diminuir esta contaminação e conseqüentemente a manutenção da hidrofiliçidade (ZHAO et al, 2005).

Superfícies altamente rugosas tendem a liberar uma maior quantidade de íons, que poderiam afetar o processo de mineralização. Felizmente a estabilidade e manutenção contínua da camada de TiO₂ tendem a minimizar este fator (COOPER, 2000). Então estão que, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que é irrelevante a liberação de íons das superfícies de cpTi após receberem tratamento superficial (MEYER et al., 2003; WENNERBERG et al., 2004). O que se observa é um aumento progressivo da camada com o passar do tempo e a deposição de íons do microambiente ósseo sobre esta; como cálcio, fosfato e enxofre (LARSSON et al, 1997).

Outra função relacionada à estabilidade desta camada seria em relação à manutenção de uma alta resistência à corrosão do titânio (PLACKO et al., 2000; RUPP et al.2006).

O significado biológico deste óxido ainda é discutível (LUNDSTROM; TENGVALL, 2005). Entretanto, acredita-se que este seja um dos motivos da excelente biocompatibilidade do metal (COOPER, 2000; RUPP et al.2006).

Uma simples observação ao microscópio pode revelar a interface osso-implante (BUDD et al., 1991). Todavia, esta para ser avaliada necessita ser preparada de acordo com a técnica de observação, o que muitas vezes leva a perda das substâncias contidas nesta região. Observa-se que a camada de óxido de titânio após a separação do implante e bloco ósseo tende a ficar aderida ao metal, o que dificulta a avaliação da estrutura da interface (BUDD et al., 1991).

Em 1992, Budd et al. propuseram a modificação na técnica de preparo por descalcificação do bloco ósseo com a utilização de um infiltrado de resina na interface, *in situ*, o que possibilitou em algumas áreas a proteção dos componentes locais. Foram observadas as presenças de íons cálcio (Ca^{2+}), fosfato (PO_4^-) e substância amorfa, relacionados com o titânio.

Ao entrar em contato com o tecido vivo através de sua reatividade, acredita-se que haja uma interação entre o titânio do implante e a atividade metabólica do sítio (RUPP et al., 2006). Sugere-se que *in vivo* a interação entre o metal e o peróxido de hidrogênio liberado pelas células inflamatórias ajude a formar e manter este composto (TiO_2). E que este teria a capacidade de promover a quelação dos íons cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (PO_4^-). Supõe-se ainda que possa haver então a ativação temporária do sistema complemento (PERALA; CHAPMAN, 1991). Sendo assim a superfície poderia agir como um dos fatores intrínsecos do processo de coagulação sanguínea (LUNDSTROM.; TENGVALL, 2005).

2.2.4 A interação célula-biomaterial

Culturas são excelentes meios de se observar os períodos evolutivos e a morfogênese celular sob condições controladas, o que facilita o entendimento do processo *in vivo* (RAJARAMAN et al, 1974).

A necessidade do entendimento da interação celular com as superfícies dos implantes ósteo-integráveis tem levado a inúmeras pesquisas (SCHNEIDER et al., 2003) com uma infinidade de modelos de culturas.

Culturas primárias de medula óssea de ratos, galinhas e humanas são algumas das quais têm se mostrado mais úteis nos estudos do metabolismo e das respostas hormonais de células osteogênicas (PURPURA; AUBIN; ZANDSTRA, 2004). Assim sendo, estes estudos têm demonstrado fatores bem interessantes em relação à interdependência superfície-célula (ZHAO et al., 2005).

O fenótipo da célula em seções de cortes histológicos nos dá valiosas pistas em relação à sua linhagem. Porém células retiradas de seu sítio original, e separadas de suas matrizes intersticiais, instaladas em um meio de cultura perdem muitas de suas características. Fato é que, grande parte das células-tronco apresentam características fibroblásticas, entretanto nem todas darão origem a estes. Porém células que tem capacidade de promover adesão e espraiamento em uma superfície podem ser denominadas células mesenquimais pluripotentes e assim obterem a diferenciação dos osteoblastos, ou apenas ter uma característica de célula osteoprogenitora e se diferenciar em fibroblasto (SCHWARTZ et al., 1999).

Células com características pluripotentes irão sofrer atuação do meio ambiente para a sua expressão fenotípica, sendo por este motivo algo a se considerar em engenharia tecidual (LIM; DONAHUE, 2004).

Quando culturas celulares são estudadas o primeiro passo é a observação do contato inicial da célula sobre a superfície. Utilizando-se biomateriais é esperado que após este fenômeno inicial ocorra a adesão ao substrato e se inicie então as interações subseqüentes para a formação da interface. Os mecanismos iniciais que comandam o contato, como já citado, residem em forças iônicas e energia de superfície (KUMARI et al., 2002).

A utilização do microscópio eletrônico de varredura (MEV) tem sido de grande valia para o estudo de culturas e a sua utilização tem proporcionado entre outras, a identificação da elaboração da linha de cimento primária e deposição de matriz extracelular colágena (PARKER; SHIGA; DAVIES, 1999).

Uma variedade de meios de cultura têm sido disponibilizados para o estudo *in vitro* dos osteoblastos. E muitos dos fatores contidos nestes estarão disponíveis *in vivo* na matriz óssea, sendo mandatórios no processo de mineralização (DUMPLOMB et al., 2006). Quando células osteogênicas são cultivadas em

presença de ácido ascórbico e fosfato orgânico (por exemplo β -glicerofosfato) o que se pode notar é uma discreta formação de nódulos de calcificação característicos de osso neoformado. Estes nódulos têm se mostrado sugestivos dos estágios finais de proliferação/diferenciação de células osteoprogenitoras e já tem sido utilizados na diferenciação de células humanas pluripotentes para a modulação e formação de células osteoblásticas. Outros aditivos têm mostrado a possibilidade de aumentar a formação de nódulos *in vitro*. Os glicocorticóides como a dexametasona (Dex), quando adicionada aos meios de cultura, de maneira dose dependente, parecem desempenhar satisfatoriamente esta função (CHEN et al., 1994; DUMPLOMB et al., 2006). CHEN et al. (1994), observaram que a Dex introduzida no meio de cultura também induziu a transformação da forma alongada à poligonal em osteoblastos e aumentou a atividade da ALP, sendo esta essencial à mineralização da matriz osteóide. Entretanto, em um estudo com culturas primárias de calvárias de ratos, PURPURA; AUBIN; ZANDSTRA (2004) demonstraram que a densidade celular é tão, ou mais importante que a adição do hormônio. Por exemplo, colônias de formações osteogênicas (CFU-O), são dependentes da Dex inicialmente, porém quando atingem altas densidades, esta necessidade é diminuída, ou até mesmo independente para que ocorra a completa diferenciação da unidade celular.

Dos tipos celulares estudados, as diferentes linhagens com características de osteoblastos (*osteoblast like cells*) têm demonstrado diferentes resultados sobre superfícies; estando cada uma delas indicada para determinado tipo de avaliação (tabela 1) (SCHWARTZ et al., 1999).

Divergências ocorridas em resultados de estudos que utilizam *osteoblast like cells* podem residir no fato da origem da célula selecionada (ROSA; BELOTI, 2003; SADER et al., 2005). Como exemplo as células derivadas do osteossarcoma não apresentam total diferenciação *in vitro* (vide tabela 1) estando indicadas para avaliação de eventos iniciais, como por exemplo a adesão.

LUMBIKANONDA; SAMMONS (2001), ainda concordam que estas divergências podem estar ainda associadas a metodologias dos experimentos que negligenciam, por conseguinte a manipulação, acondicionamento e desenho externo das fixações.

Tabela 1 – Quadro comparativo de células com comportamento de osteoblastos utilizadas em procedimentos de culturas

| Células FRC | Células MG63 | Células OCT1 | Células MLO-Y4 |
|---|---|--|---|
| Osteoprogenitor Multipotente | Osteoblastos não Diferenciados | Osteoblastos Secretores | Osteócitos |
| Nódulos Migratórios de multicamadas | <div style="text-align: center;">  </div> ALPase Proliferação | Alta ALPase Baixa Osteocalcina Alta Osteopontina | Baixa ALPase Alta Osteocalcina Conexina43 |
| Com depósito d HA quando tratada com Dex + β GP | Não ocorre calcificação em cultura | | |
| Ratos | Osteossarcoma Humano | Rato Transgênico produtor de Osteocalcina | Rato Transgênico produtor de Osteocalcina |

Fonte- SCHWARTZ, Z. et al. Implant Surface Characteristics Modulate Differentiation Behavior of Cells in the Osteoblastic Lineage. *Adv Dent Res*, v.13, p.38-48, 1999.

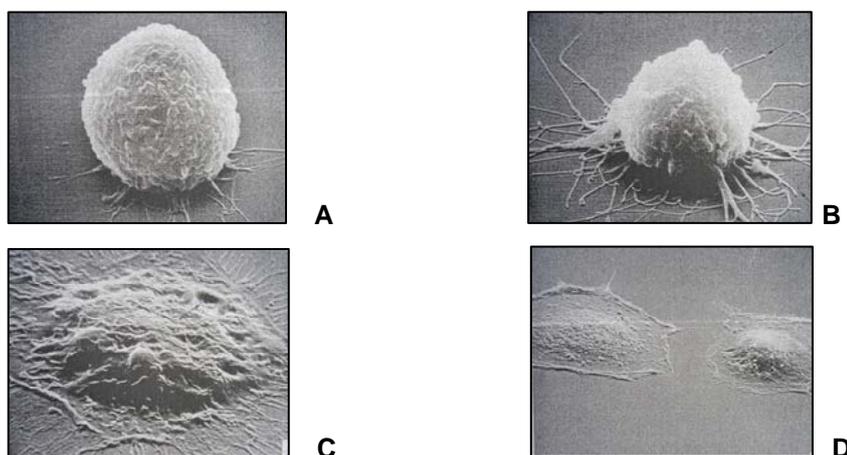


Figura 5 – Estágios da adesão celular. No primeiro estágio (A), logo após o contato da célula com o biomaterial são notadas pequenas extensões do citoesqueleto (filópodes), em seguida (segundo estágio) estas extensões tornam-se mais visíveis (B) e são chamadas de lamelópodes (*cytoplasmic webbing*). E no terceiro estágio (C) é observado o espreadimento circunferencial, dando sequência então ao quarto estágio (D) (total espreadimento).

Fonte: RAJARAMAN, R. et al. A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. *Exp Cell Res*, v.88, p.327-339, 1974.

SAMMONS et al. (2005), concluem que ainda não há um consenso sobre o comportamento celular sobre diferentes superfícies.

A atividade dos osteoblastos, assim como a expressão de matriz colágena e mineralização como já citado, depende de vários fatores, sendo estes locais e sistêmicos para que os osteoblastos possam expressar as proteínas da matriz. Em contrapartida, estes responderão aos hormônios osteotrópicos, incluindo o hormônio para-tireoideano (PTH), prostaglandina E₂, 1,25 Di-hidroxi vitamina D e glicocorticóides como a dexametasona (Dex) (PURPURA; AUBIN; ZANDSTRA, 2004).

2.2.5 A engenharia óssea e as possibilidades com os estudos das células-tronco e fatores osteogênicos da medula óssea

2.2.5.1 As células-tronco

MUSCHLER, G.F.; NAKAMOTO, C.; GRIFFITH, L.G. (2004) definem célula-tronco como um tipo celular especial que tem a possibilidade de auto-renovação (figura 6). Este processo ocorrerá através de um estímulo que promoverá uma divisão celular assimétrica. Como produto haverá uma célula idêntica à célula mãe e uma outra com funções biológicas diferentes daquela. Estas células (células filhas) terão diferentes destinos. Aquela que ficou com características iguais as da célula mãe voltará ao repouso (célula-tronco) até que novo estímulo aconteça. A outra se proliferará simetricamente e será denominada célula progenitora (células transitórias), dando origem a tecidos diferenciados.

A capacidade de auto-renovação possibilitará a manutenção da população de células-tronco. Caso contrário, a diminuição deste tipo celular poderia acarretar sérias conseqüências em manutenção e renovação tecidual (MUSCHLER; MIDURA; NAKAMOTO, 2003), uma vez que, mesmo tendo um pequeno potencial de auto-renovação, as células progenitoras tenderão a se diferenciar não voltando mais ao estado original.

As células-tronco serão encontradas não somente nos estágios iniciais da vida, mas também no indivíduo adulto, embora em uma menor população (MUSCHLER; MIDURA; NAKAMOTO, 2003), e serão responsáveis pela manutenção, renovação e reparação de injúrias decorrentes do processo de vida do indivíduo (MUSCHLER; NAKAMOTO; GRIFFITH, 2004). Sugere-se que, após a

diferenciação dos tecidos do embrião as células-tronco possam ficar aprisionadas temporária ou definitivamente em cavidades específicas de cada órgão. Aonde algumas venham a ter a capacidade de manterem-se pluripotentes ou multipotentes, diferenciando-se em outros tecidos, enquanto as demais se tornariam uni potentes através de mudanças nucleares irreversíveis (MUSCHLER; MIDURA; NAKAMOTO, 2003).

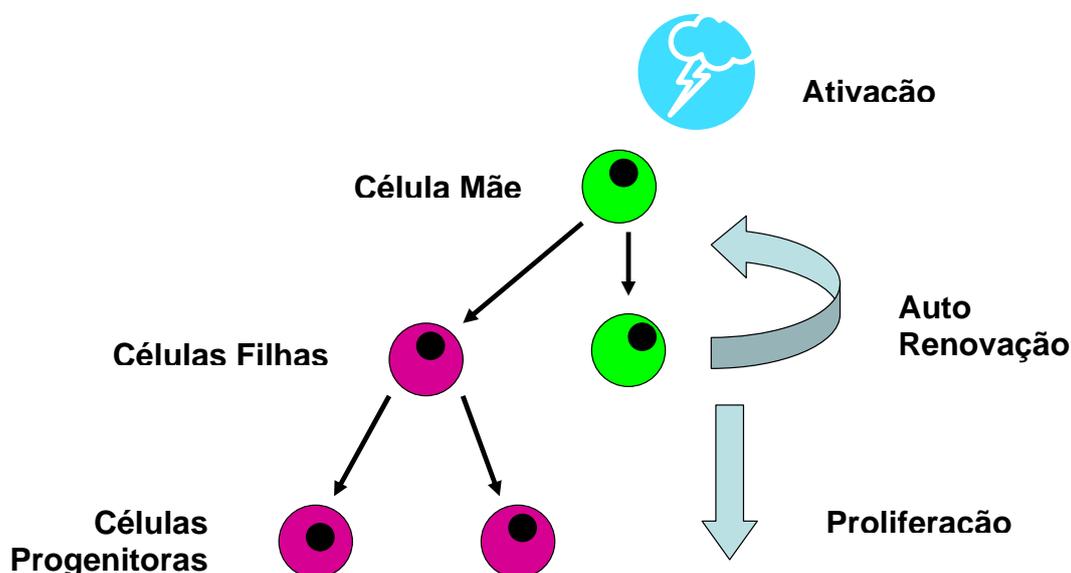


Figura 6 – Auto-renovação da célula-tronco. Após sua ativação a célula-tronco (célula mãe) dará origem a dois tipos celulares distintos através de uma divisão celular assimétrica. O resultado desta divisão é a geração de células filhas com diferentes características. Será gerada uma célula com poder de auto renovação e características idênticas à célula mãe que voltará a forma “tronco”. A finalidade deste comportamento é a manutenção desta população celular. A outra célula gerada terá características de célula progenitora e dará origem a tipos celulares diferenciados que formarão os mais diversos tecidos. As células-tronco dividem-se em embrionárias (totipotentes) e adultas (multipotentes ou pluripotentes).

Como já citado, pesquisas com células-tronco têm levado a inúmeras possibilidades em engenharia tecidual. Dentre os tipos celulares estudados podemos citar as células embrionárias e adultas. A diferença entre estas residirá em que as células embrionárias apresentar-se-ão totipotentes, enquanto as adultas

seriam na maioria das vezes deficitárias na diferenciação em tecidos que não os de sua origem (MUSCHLER; MIDURA; NAKAMOTO, 2003). O que poderia ser observado nas células adultas seria um potencial de plasticidade (UNITED STATES OF AMERICA – NIH, 2007).

As células embrionárias são aquelas que darão origem ao blastocisto, que consiste de uma “massa” de células em torno de 3 a 5 dias de desenvolvimento antes de sua implantação na cavidade uterina (DUMPLOMB et al, 2006). Posteriormente, este originará todos os demais tipos celulares (MUSCHLER; MIDURA; NAKAMOTO, 2003) diferenciando-se nos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma) (CHIAPASCO et al., 2007).

Devido a sua capacidade “totipotente” e grande interesse científico, divergências tem sido geradas tanto na comunidade científica mundial como na sociedade civil e religiosa em relação ao uso do blastocisto em pesquisas de bioengenharia (HALL; STOJKOVIC; STOJKOVIC, 2006).

Em 09 de Agosto de 2001 a Agência Nacional de Saúde Americana (The National Institutes of Health – NIH) estabeleceu as seguintes normas para a utilização de células embrionárias (UNITED STATES OF AMERICA – NIH, 2001):-

- Células-tronco com finalidade terapêutica devem ser derivadas de embriões gerados com esta finalidade;
- Os embriões não devem ser utilizados rotineiramente para métodos terapêuticos ou de pesquisas;
- Consentimento esclarecido deve ser requisitado ao doador do embrião;
- Não poderá ser comercializado de qualquer maneira o embrião. Somente poderá ser utilizado por doação.

Embora as células embrionárias possuam um potencial regenerador tecidual praticamente infinito, as pesquisas com células adultas vêm tomando bastante força após algumas mudanças dos paradigmas atuais. Além dos já citados problemas éticos, enormes controvérsias tem surgido em relação à utilização de heteroplasmas e a possibilidade da geração de padrões anômalos. Estas anomalias poderiam gerar padrões de reprogramações nucleares incorretos (HALL; STOJKOVIC; STOJKOVIC, 2006).

A literatura tem mostrado que comunidades celulares como, por exemplo, células derivadas do estroma ósseo, músculo e tecido adiposo apresentam grande plasticidade. Isto tem impulsionado a pesquisa científica no sentido da exploração

destes tipos celulares de forma mais incisiva. Soma-se ainda que algumas células adultas pareçam ter a possibilidade de se diferenciar em diversos outros tipos celulares dos três folhetos embrionários, mostrando-se então pluripotentes (VAN DAMME et al., 2002; MUSCHLER; MIDURA; NAKAMOTO, 2003). Na mesma linha de raciocínio, CHIAPASCO et al. (2007) observam que a utilização de fatores de crescimento adicionados às culturas de células estromais são um caminho interessante a se seguir.

BARNETT et al. (2000) observaram a possibilidade da utilização de transplantes de células da mucosa olfatória em doenças degenerativas nervosas. Estudos em camundongos mostraram a possibilidade da reestruturação da bainha de mielina com a utilização destas células.

Mais recentemente, LIMA et al (2006) demonstraram resultados animadores em estudos clínicos com humanos e lesões de medula espinhal utilizando-se dos tipos celulares citados acima. As células da mucosa olfatória parecem ter a possibilidade de manterem características embrionárias (totipotentes) mesmo na fase adulta.

Baseado nestes princípios parece ser correto imaginar que a utilização de bio-reatores associados às inúmeras possibilidades que vêm sendo criadas em engenharia de tecidos seja um caminho ético na pesquisa da reconstrução de partes perdidas ou na cura de doenças.

2.2.5.2 Os fatores osteogênicos da medula óssea

A possibilidade da utilização de células da medula óssea vermelha como um fator potencial para a formação óssea foi sugerido inicialmente por Goujon no início de 1869 (CONNOLLY et al, 1989). Em 1968, Fridenstein e colaboradores as denominaram células multipotentes da medula óssea, e estabeleceram que células aderentes, com capacidade de clonagem, não fagocitárias e com características fibroblásticas poderiam ser encontradas em indivíduos na fase pós natal (BIANCO; ROBEY, 2000; MUSCHLER; BIANCO et al. 2001; MIDURA; NAKAMOTO, 2003). A demoninação multipotente ou pluripotente reside no fato de que estas células, assim como as células musculares e adiposas, apresentam a capacidade de diferenciarem-se de forma discreta em diversos outros tipos de fenótipos celulares, incluindo osso, cartilagem, tendões, ligamentos, músculo, células adiposas e

nervosas (figura 8) (MUSCHLER; MIDURA; NAKAMOTO, 2003), ao contrário das células que darão origem ao tecido cartilaginoso (estas células se diferenciarão somente em células cartilagosas). (BIANCO et al. 2001; MUSCHLER; NAKAMOTO; GRIFFITH, 2004).

A medula óssea (figura 7) consiste em um complexo formado por vários tipos celulares que irão interagir e coexistir de forma sinérgica, tanto do sistema hematopoiético como do próprio estroma medular. Após o nascimento, é iniciada a produção das células sanguíneas neste sítio. O desenvolvimento da medula ocorrerá então de acordo com a colonização de precursores sanguíneos ocupando as cavidades ósseas e cartilagosas, formando uma íntima ligação, e profunda interdependência entre estes tecidos (TAICHMAN; EMERSON, 1998).

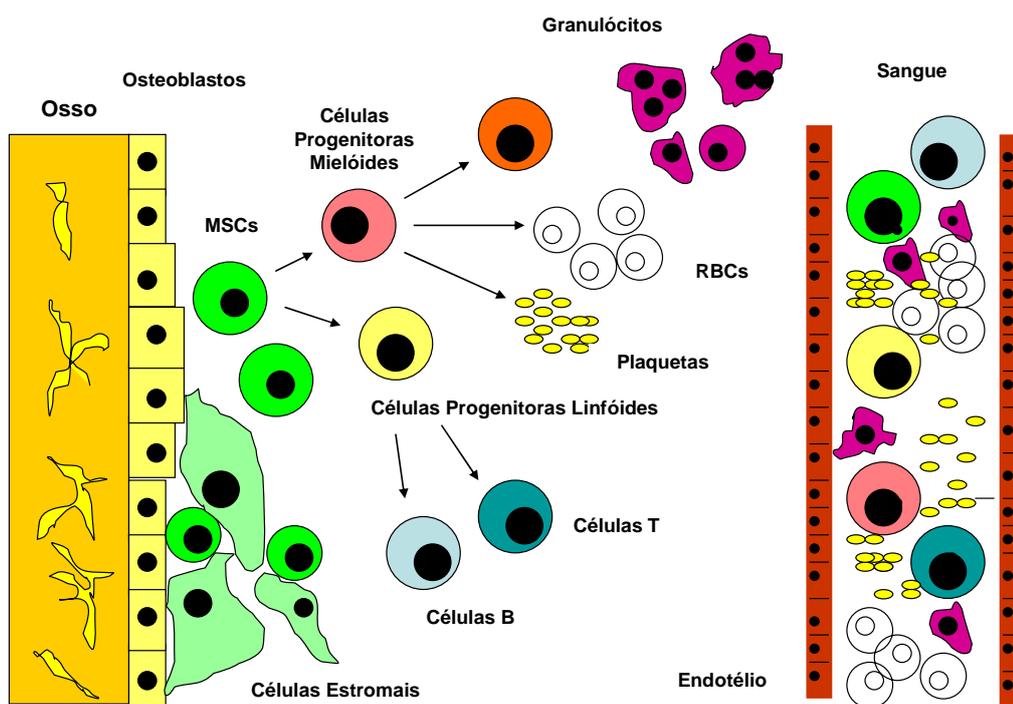


Figura 7 – Arquitetura da medula óssea (adaptado). A interação entre os sistemas hematopoiético e estromal.

Fonte: TAICHMAN,R.S.; EMERSON,S.G. The Role of Osteoblasts in the Hematopoietic Microenvironment. *Stem Cells*, v.16, p.7-15, 1998.

As células mesenquimais pluripotentes estarão disponíveis na hematopoiese medular e darão origem a várias outras linhagens com funções de formação teciduais diversas (figura 8, página 53) (BIANCO, et al., 2001). Entretanto, nem todas as células do estroma ósseo suportarão a hematopoiese. Supõe-se que apenas discretos elementos celulares tenham esta função. Quanto ao estroma, este será responsável não somente pelas células de suporte hematopoiético, mas contribuirá também para a formação óssea, através da intimidade e características fenotípicas entre as células ósseas e as células estromais, que são responsáveis por este fenômeno (TAICHMAN; EMERSON, 1998; VAN DAMME et al, 2002).

A utilização de experimentos *in vitro* e *in vivo* (PARKER; SHIGA; DAVIES, 1999) para a explicação dos fatores decorrentes dos mecanismos moleculares que comandam as células tem auxiliado de forma marcante o desenvolvimento da engenharia óssea. Onde a utilização de células do estroma da medula óssea pelo que se observa, parecem ser ferramentas a serem utilizadas (TULI et al., 2003). Entretanto cuidados devem ser tomados tanto na metodologia como na seleção do tipo de célula e seu comportamento no microambiente (fatores exaustivamente observados nesta revisão).

Baseados em estudos anteriores de Simmons e Torok-Storb, onde estes autores conseguiram identificar células $CD34^+$ do estroma da medula óssea como potenciais progenitoras de diversos tecidos, CHEN et al. (1997) investigaram a possibilidade de um marcador hematopoiético (CD34) encontrado na camada monuclear de baixa densidade da medula óssea (LDMN) poder ser observado em células osteoprogenitoras.

Ao cultivarem células $CD34^+$ aspiradas da medula óssea humana em condições osteogênicas observaram o potencial destas se diferenciarem em osteoblastos morfologicamente normais (CHEN et al., 1997). Estes autores comentam que seus resultados são conflitantes a estudos progressos; e discutem a possibilidade das divergências serem frutos decorrentes de metodologias diversas. Em relação não padronização dos métodos, BALDUÍNO (2006) vem demonstrar que equívocos são gerados por autores que não diferenciando a medula hematopoiética da população estromal tendem a obter resultados errôneos. Este autor observa atentamente que as células osteoblásticas são formadas a partir das colônias de células fibroblastóides (CFU-F ou *Colony Forming Unit-Fibroblast*). Em relação as células $CD34^+$, TAICHMAN; EMERSON (1998) já as classificavam como precursoras

de osteoclastos. Estes dados demonstram o quanto ainda há que ser observado e estudado neste campo. Fato é que, terapias genéticas tem utilizado e explorado cada vez mais o potencial das células do estroma da medula óssea. Esta população tem promovido a expressão de várias proteínas *in vitro* e *in vivo* capazes de combater diversos tipos de patologias ou desordens de maneira geral (VAN DAMME, 2002).

CONNOLLY et al. (1989) demonstraram em um modelo animal obtido da aspiração da crista ilíaca posterior de coelhos brancos Nova Zelândia adultos, que transplantes autólogos de medula aceleram substancialmente a reparação óssea. A proposta destes autores residiu na possibilidade de um protocolo simples e com grande potencial. Onde a aspiração da medula foi realizada através de punção. Os demais processos foram então desenvolvidos extra-corpóreos e inseridos em sítios ectópicos preparados (osteotomizados) previamente, diminuindo assim a morbidade. Segundo seus resultados os autores sugeriram a possibilidade destes procedimentos minimizarem a utilização de enxertos ósseos. Em suas observações ainda descreveram que o potencial osteogênico dependerá do volume de células presentes.

Terapias com MSCs em implantologia tem demonstrado resultados promissores em relação aos métodos tradicionais. YAMADA et al (2004), demonstraram em um modelo animal (figura 3, página 36) que a injeção de MSCs com plasma rico em plaquetas (PRP) obteve uma mineralização mais rápida que o grupo controle sem qualquer otimização. O PRP tem sido utilizado por seu potencial de adesividade proporcionado pela fibrina, além de conter fatores de crescimento ósseos (YAMADA et al., 2004). Estes autores também fizeram referências em relação à baixa morbidade deste tipo de técnica.

Entretanto uma grande margem de pesquisadores acredita que estudos em animais embora norteiem o caminho a seguir, não superam a utilização de células humanas, devido a fatores como biocompatibilidade. O que se tem observado é que as novas tendências vão além dos eventos biológicos, sendo focadas em engenharia óssea e de biomateriais (PARKER; SHIGA; DAVIES, 1999).

TULI et al. (2003) comentam que culturas *in vitro* de osso humano derivado de células da medula óssea tem servido como excelente forma de se estudar a biologia osteoblástica. E assim como VAN DAMME et al. (2002), observam o potencial deste material como de grande relevância no reparo tecidual, seja este de

ordem patológica ou traumática, devido as imensas possibilidades de culturas e linhagens obtidas (figura 8 e 9, páginas 53 e 55).

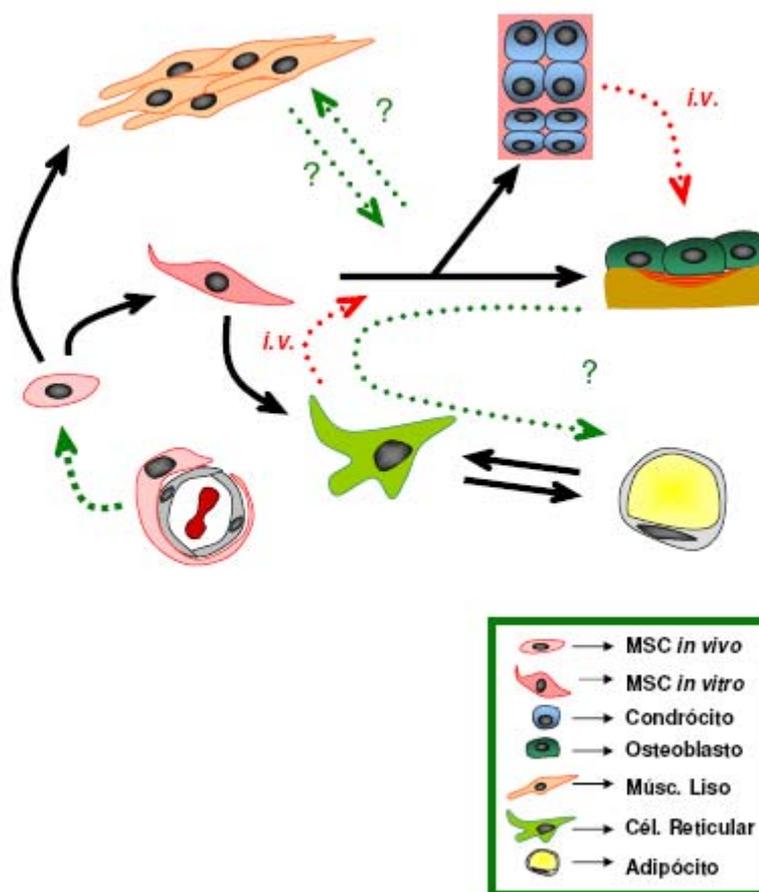


Figura 8 – Representação da pluripotencialidade das células-tronco mesenquimais encontradas na medula óssea de camundongo adulto. As setas indicam possíveis caminhos de diferenciação e apresenta a flexibilidade entre determinados fenótipos. MSC – célula-tronco mesenquimal; i.v. – *in vitro*; **seta verde tracejada** – ainda não demonstrado *in vivo* e dado controverso *in vitro*; **seta vermelha tracejada** – mostrada somente *in vitro*.

FONTES: BALDUÍNO, Alex. **Análise Celular e Molecular do Componente Estromal da Região Subendosteal da Medula Óssea: O Nicho das Células Tronco Hematopoiéticas**. Rio de Janeiro, RJ, 2006. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

A utilização de células originárias do estroma da medula óssea com a finalidade de estudos de engenharia tecidual parece ter ainda como vantagem a obtenção de células tanto para a cultura como para o experimento (CONNOLLY et al, 1989; YAMADA et al., 2004) oriundas do mesmo sítio doador. Entretanto, a identificação e manutenção das MSCs dependem de métodos eficientes, assim como coleta, cultura *in vitro*, tipo de substrato de cultura, suplementos metabólicos

para proliferação e diferenciação e meio de cultura específico. De suma importância também é que se standardizem os sistemas de culturas; um dos motivos pelos quais ainda existam divergências em resultados experimentais (TULI et al., 2003).

Como standardização, TULI et al. (2003), compararam a utilização de dois meios de cultura mais utilizados:

1. *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM);
2. DMEM com Kaighn's modificado por Ham's F12 (DMEM-F12K), com adição de ácido ascórbico e L-glutamina.

As análises das culturas demonstraram que o meio DMEM demonstrou ser significativamente mais efetivo em estimular a proliferação óssea e formação de colônias.

Segundo os autores supracitados, devido às dificuldades entre tipos celulares a serem selecionados, bem como as diversas metodologias, parece ser imprescindível que se normatizem as culturas, afim de que se tornem cada vez mais precisas as informações em terapia tecidual.

PARKER; SHIGA; DAVIES (1999) propõem uma metodologia para o crescimento de osso humano *in vitro*. Estes autores baseados em estudos de Maniatopoulos et al. (PARKER; SHIGA; DAVIES, 1999) realizaram pesquisas onde conseguiram descrever as seqüências que levam a formação óssea. Em seus estudos demonstraram que os eventos se iniciam através da produção de uma linha de cimento que se mineraliza sobre o substrato no qual as células são cultivadas. Logo em seguida a deposição de matriz colágena é notada, e então osteócitos são observados na região. Segundo seus dados estas características parecem mimetizar a remodelação *in vivo*.

Com estes subsídios os autores citados utilizaram os mesmos critérios e metodologia com a finalidade de cultivo de células ósseas humanas. Suas conclusões foram as seguintes:

“Demonstramos que a ultra-estrutura da matriz produzida em culturas celulares de medula óssea humana tem todas as características morfológicas de elaboração de matriz óssea. Isto inclui o estabelecimento de uma camada protéica afibrilar com capacidade de mineralização, seguida de uma porção de matriz colágena contendo osteócitos, os quais se tornam maduros e em estágio de mineralização. Este tipo de mineralização compreendendo formação de nódulos é limitado somente a porção da população celular, e difere da biomineralização distrófica reportada previamente. Ainda

demonstramos que as células remanescentes são capazes de formação de matriz óssea seguindo a expansão da cultura.” (PARKER; SHIGA; DAVIES,1999).

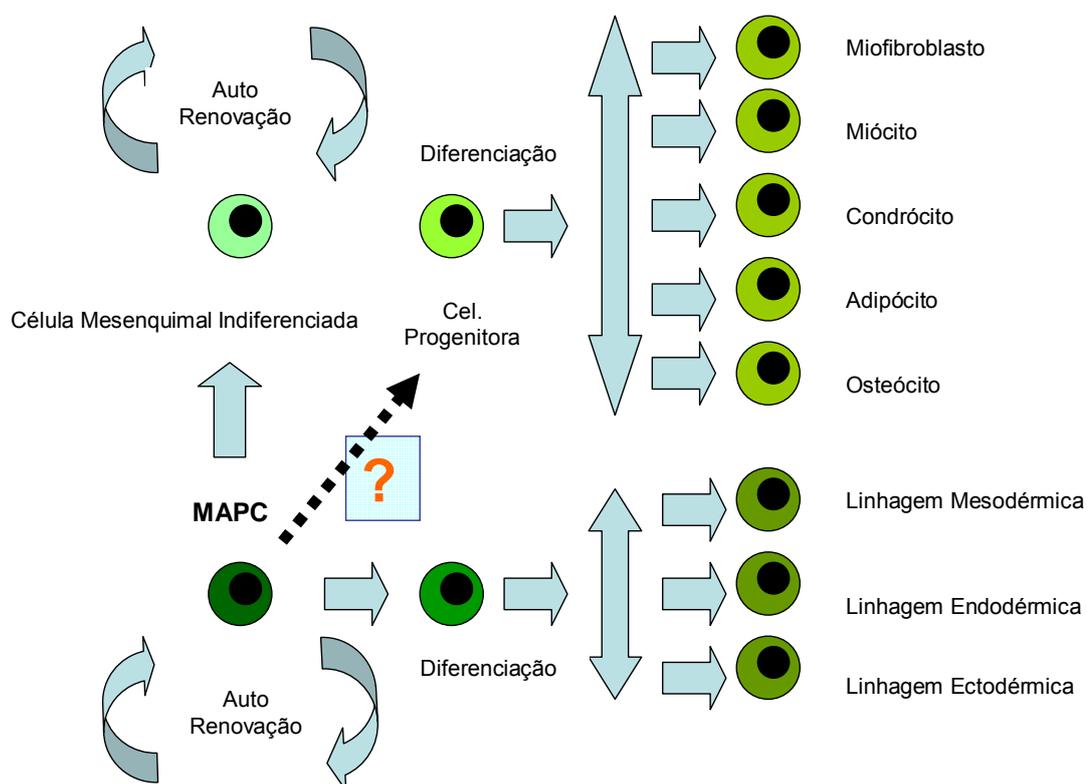


Figura 9 – As diversas linhagens de células do estroma da medula óssea. As células do estroma medular formam a matriz reticular, mas também consistem de células mesenquimais indiferenciadas (MSCs) que mantêm uma renovação própria por proliferação sem diferenciação. Estas células podem se diferenciar sob controle *in vitro* mimetizando o comportamento *in vivo*, diferenciando-se em linhagens múltiplas como osteogênicas, condrogênicas, tendogênicas, adipogênicas e miogênicas, que eventualmente darão contribuição a formação de tecidos mesenquimais (osso, cartilagem, músculos, estroma medular, ligamentos, tendões, gordura, derme e tecido conjuntivo). Há ainda outro tipo de célula mesenquimal pluripotente, identificada como uma fração aderente da medula óssea, designada MAPC. Estas células são capazes de se diferenciarem dentro das células mesenquimais indiferenciadas e dentro de outros tipos celulares transformando-se em endodérmicas, mesodérmicas e ectodérmicas com camadas germinais. De uma maneira geral as BMSCs e MAPCs são tidas como células do estroma medular ósseo e com capacidade pluripotente. .

Fonte: VAN DAMME,A. et al. Bone Marrow Stromal Cells as Targets for Gene Therapy. **Current Gene Therapy**, v.2,p.195-209, 2002.

2.2.6 Os implantes dentários

Implantes dentários são biomateriais com a finalidade de reconstrução funcional e estética do aparelho mastigatório (STENPORT et al., 2003), e geralmente são utilizados quando este apresenta seqüelas decorrentes do edentulismo.

LEMONS; PHILLIPS (1993) consideram crítica a escolha do metal ou liga metálica dos implantes cirúrgicos. E ainda mais dos implantes odontológicos, uma vez que estes estarão transmucosos, podendo colocar em risco a integridade sistêmica.

Dentre os diversos tipos de materiais para implantes, os mais utilizados em odontologia estão-:

- 1) cpTi (Titânio Comercialmente Puro) – Possui 99% de titânio em média.
- 2) Ti-Al-V (Liga de titânio-alumínio-vanádio) – Possui 90% de titânio, 6% de Alumínio e 4% de Vanádio em média.

O cpTi parece promover uma maior biocompatibilidade em relação às demais ligas de uso médico (MICULESCU et al. 2005), com resultados altamente previsíveis (ABRAHAMSSON et al., 2001).

As ligas metálicas como as de Ti-Al-V segundo alguns autores, devem ter seus parâmetros de utilização repensados. Estudos *in vitro*, demonstraram uma grande estimulação de células fagocitárias em presença deste material, além de uma importante liberação de íons em relação a humanos (818 µg/g) (ROGERS, et al., 1997). Entretanto *in vivo*, ICHINOSE et al. (2003) notaram estabilidade tecidual com a utilização desta liga porém, seus estudos basearam-se apenas em análise microscópica.

Como visto, as propriedades superiores e menos discutíveis do cpTi fazem deste metal a primeira escolha em fixações médico/odontológicas. Todavia, como deficiência, este material possui relativa fragilidade quando comparado às ligas de titânio e mesmo ao tecido ósseo. Por este motivo, desenhos de implantes que distribuam melhor as cargas mastigatórias são importantes quando de sua utilização (LEMONS; PHILLIPS, 1993).

Dentre as propriedades do titânio, uma das mais exploradas nos últimos anos tem sido a rugosidade superficial (R_a), modificada pelos condicionamentos que o

metal vem sofrendo na tentativa de se conseguir a expressão do fenótipo osteoblástico de uma forma mais rápida. Tendo como consequência um menor período de espera reparadora na interface biológica. (SCHNEIDER et al. 2003; POSTIGLIONE et al. 2003; ALBREKTSSON; WENNERBERG 2004 [a]; ALBREKTSSON; WENNERBERG 2004 [b] ; SADER et al. 2005).

A topografia como um todo e a química das superfícies dos implantes também vem sendo avaliadas com grande relevância a fim de se elucidar melhor os mecanismos biológicos. Porém ainda há poucas informações de como estes fatores interagem na fisiologia óssea (LARSSON; et al, 1997; MEYER et al., 2005).

Per-Ingvar Brånemark fez a instalação de seu primeiro implante de titânio em 1965. Seus resultados iniciais não foram promissores (cerca de 50%), e de certa maneira contribuíram para que se confirmassem às suspeitas de que materiais estranhos ao corpo humano não deveriam ser utilizados na cavidade oral (ALBREKTSSON; WENNERBERG 2005).

Em 1981, ao final de um estudo prospectivo de longo prazo, entre julho de 1965 a setembro de 1980 (ADELL et al, 1981), foi criado um protocolo de previsibilidade com a utilização dos implantes osseointegrados.

Em 1986 dois outros estudos propuseram uma avaliação das reações teciduais dos implantes dentários e critérios de sucesso para as fixações (ADELL. et al, 1986; ALBREKTSSON et al, 1986).

A definição original de osseointegração seria a de uma conexão firme, direta e duradoura entre o osso vivo e o implante de titânio, na forma de parafuso com um desenho bem definido (ADELL et al., 1981). Entretanto, estes dados demonstram um fenômeno estático, contrário ao tipo de micro-ambiente encontrado (BLAIR, 2002). Com o advento de avançadas técnicas de magnificação este conceito veio tendo profundas modificações (ALBREKTSSON e JACOBSSON, 1987; BUDD et al., 1991).

Binon, ao final do século passado, estimou haver acima de 90 tipos de sistemas de implantes dentais sendo fabricados e comercializados, com uma grande variedade de diâmetros, comprimentos, superfícies, plataformas, interfaces e desenhos externos. Sugere-se que haja bem mais fabricantes nos dias atuais.

O sucesso de uma terapia de implantes entre outros, reside em uma técnica cirúrgica apurada (ADELL et al., 1986; ALBREKTSSON; JACOBSSON, 1987; HARRIS; KOHLES, 2001; RAMP; JEFFCOAT, 2001; BENINGTON, 2002; ERCOLI et

al., 2004), e um desenho que promova uma boa estabilidade primária (NIZNICK, 2000; GEURS et al., 2002), onde a macro e microestrutura devam estar alinhadas em harmonia.

SYKARAS et al. (2000) observam a necessidade do clínico em dominar os eventos biológicos da osseointegração devido aos lançamentos constantes da indústria, onde superfícies com bioatividade têm ganhado considerável espaço.

ALBREKTSSON; WENNERBERG (2005) concordam com os autores supra citados, e fazem uma previsão otimista onde superfícies com características biotivas se tornarão populares em um futuro próximo. Segundo estes autores, a vantagem está em que, as superfícies quimicamente ativadas parecem promover uma adesão mais rápida em contraste com as superfícies biomecânicas dos implantes atuais; que necessitam de uma integração lenta onde as células ósseas têm que “invadir” suas irregularidades.

Todavia, mesmo com a gama de estudos disponíveis e previsões otimistas têm-se observado que muitos sistemas estão sendo comercializados sem embasamento científico relevante, além de diversas cópias sem maiores cuidados. O que tem levado a grandes confusões entre os usuários dos mais diversos implantes osteointegráveis, e conseqüentemente aos resultados finais de seus trabalhos (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004[b]; BRUNSKI;PULEO;NANCI, 2000; BRUNSKI, et al., 2005). Gerando desta maneira possíveis problemas futuros aos seus pacientes.

Mesmo assim, o avanço nas pesquisas vão tornando cada vez mais claros os eventos que ocorrem na interface osso-implante. Conceitos teóricos atuais definem um segundo fenômeno após a osseointegração; a osseopercepção, onde pacientes relatam a ativação do potencial tátil com a instalação de próteses sobre os implantes de titânio (KLINEBERG; MURRAY, 1999; BRÅNEMARK, 2001).

Uma vez instalado um implante de titânio em tecido ósseo é esperado que este seja integrado através de um fenômeno de interfaces (osseointegração) e assim ocorra a homeostasia (BRÅNEMARK, 2001). Todavia nem sempre é o que observamos.

Insucessos em implantodontia, entre eles a perda de fixações, segundo os dados atuais, apresentam-se na ordem de 3% a 10% (UEHARA; TAKAOKA; ITO, 2004). Entre as possibilidades de falhas a qualidade e densidade óssea tem sido

foco de algumas discussões (ROBERTS et al. , 1992; DAO; ANDERSON; ZARB, 1993; BRUNSKI, 1999; SLOTTE et al.,2003).

McMILLAN, et al. (2000) discutem que a o contato na interface parece ser mais importante que a própria qualidade óssea.

SLOTTE et al. (2003) relataram ter obtido um aumento qualitativo em regiões de baixa densidade óssea após a instalação de implantes osseointegrados.

Embora ainda questionada, a densidade óssea é um assunto ainda em pauta, visto que as maiores perdas de fixações residem em regiões de menor densidade (NIZNICK, 2000).

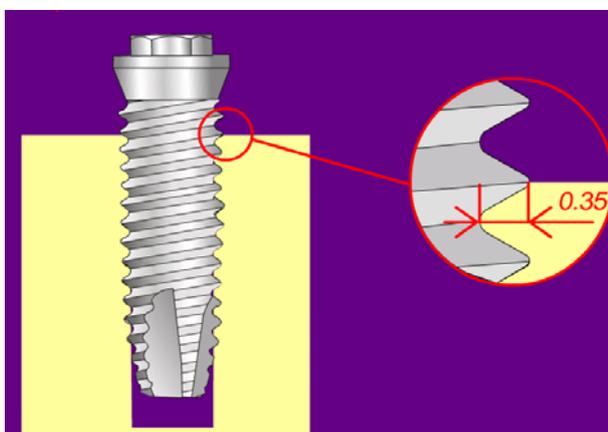


Figura 10 – Figura ilustrativa de um implante ósteo-integrável de Ø 4.0. Este implante é provido de rosca triangulares com 0,35 mm de profundidade.

Fonte: Neodent Implante Osteointegrável (Curitiba-PR-Brasil)

2.2.6.1 Aspectos relacionados às superfícies dos implantes dentários

A resposta a qualquer tipo de biomaterial instalado em tecido vivo irá depender não somente do material, mas também de sua qualidade estrutural tal como textura de superfície, porosidade e interconectividade dos poros (ANSELME, 2000; REKOW, 2003) entre outros. O mecanismo que irá ocorrer quando o implante é instalado no sítio cirúrgico dependerá de sua bio-superfície. Ela governará o tipo de adesão celular.

Após o contato inicial e a adesão sobre o biomaterial profundas modificações serão carreadas na formação da interface osso-implante (SCHWARTZ et al., 1999).

As superfícies dos implantes dentários têm sido estudadas de formas extensivas na intenção de uma melhor resposta óssea e manutenção da osseointegração (WENNERBERG, 1996; SCHWARTZ et al., 1999; SYKARAS et al., 2000; POSTIGLIONE et al., 2003; SCHNEIDER et al., 2003; ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004 [A]; BRUNSKI et al., 2005; ZHAO et al., 2005). Os principais fatores que ainda necessitam de respostas são: [1] topografia e energia de superfície (BOWERS et al., 1992; BRUNSKI, 2005; ZHAO et al., 2005); [2] materiais (KELLER, 1999; BRUNSKI, 2005) e [3] bioquímica (BAIER et al., 1988).

Embora a maioria dos eventos moleculares e genotípicos dos osteoblastos durante a integração do material ao tecido vivo sejam desconhecidos (SCHNEIDER et al., 2003), alguns estudos já vêm observando sua atividade sobre as superfícies de implantes dentais (BOYAN et al., 2003). Tem-se notado que as superfícies rugosas parecem otimizar a mineralização da matriz (COCHRAN et al., 2002).

Em relação às fixações de titânio a estabilidade primária tem sido classificada como pré-requisito para se obter a osseointegração (ADELL et al., 1981; COOPER, 2000; GAPSKI et al., 2003). Superfícies rugosas parecem ter relevância clínica dentro de uma visão biomecânica em relação à estabilidade primária (BRUNSKI, 1999; BISCHOF et al., 2004; BRUNSKI, 2005) e secundária (CARLSSON, 1988; NIZNICK, 2000; COCHRAN et al., 2002; BERNARD, 2003; BISCHOF et al., 2004; ZHAO et al., 2005). Uma estabilidade inicial melhorada tende a promover uma facilitação na expressão do colágeno e reparo da ferida óssea (LUBIKANONDA; SAMMONS, 2001; COCHRAN et al., 2002; REKOW, 2003).

Quando se observa uma superfície rugosa, esta ainda tem capacidade de ser otimizada, e promover maior resistência ao torque de remoção (CORDIOLI, 2000). Superfícies melhoradas tem demonstrado excelentes resultados através da análise de frequência de ressonância (Ostell® - Institut Straumann AG, Basel, Switzerland), com um coeficiente de estabilidade do implante (ISQ) na ordem de aproximadamente 58.0 para a estabilidade primária e 96.0 para a secundária, em uma escala de 1-100 (BISCHOF et al., 2004). RUPP et al. (2006), observam que além da rugosidade, uma superfície que possibilite uma hidrofiliabilidade plena através de modificações químicas, concorrerá para um sensível aumento do contato osso-implante.

O grau de rugosidade e a topografia da superfície como um todo, podem então diferenciar sensivelmente o resultado da resposta celular (SCHWARTZ et al., 1999 ; ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004[A]).

Alguns estudos focados em propriedades físico-químicas das superfícies de titânio tratadas têm demonstrando que o tipo de condicionamento do metal influenciará na topografia e tipo de rugosidade, além da espessura e composição da camada óxido, dos níveis de contaminantes, etc. (LARSSON et al, 1997).

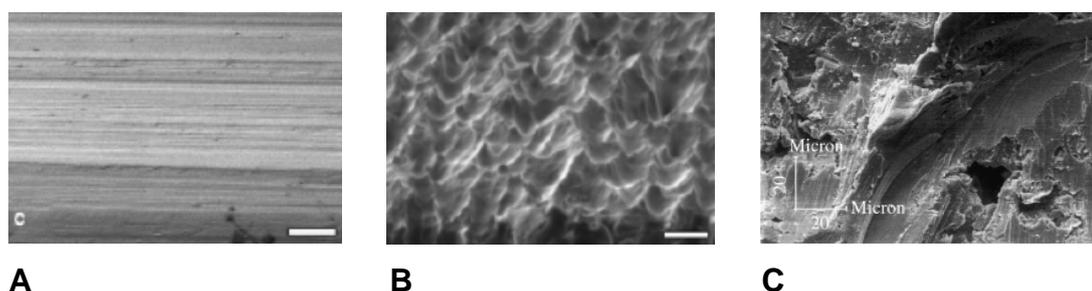


Figura 11 – Diferentes topografias de superfícies de implantes

A – Superfície lisa. São notados sulcos provenientes do processo de usinagem. Escala 10 μ m.

B – Superfície rugosa tratada por ácidos. São observados os chamados “micro picos” e vales. Escala 10 μ m.

Fonte: TAVARES,M.G. et al. Treatment of a commercial machined surface titanium implant with H₂SO₄ enhances contact osteogenesis. **Clin Oral Impl Res**, v.18, p.452-458, 2007.

C – Superfície jateada. Apresentam maiores irregularidades (macro-rugosidades) características do material utilizado no jateamento. São observados vales profundos. Escala 20 μ m.

Fonte: 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.

Apesar do TiO₂ ter uma boa estabilidade, quando exposto a contaminação do ar tende a sofrer ação de hidrocarbonetos inerentes a este ambiente, que diminuirão a energia superficial livre, aumentando assim o valor dos ângulos de contato. Observa-se que superfícies lisas podem chegar até a 90° nestas condições. Superfícies de titânio com ângulos de contato nesta ordem tendem a ter uma menor adsorção de proteínas, afetando também as respostas celulares (RUPP, et al., 2006).

O grau de rugosidade das superfícies conhecido como rugosidade superficial (R_a), é definido como sendo a média aritmética entre picos e vales das superfícies dos implantes, e tem sido utilizado como um típico marcador para o valor de rugosidade nestes artefatos. Todavia, uma superfície pode ter diferentes morfologias no todo. Então outras medidas como a distância entre os picos (S_{cλ}) também tem sido utilizadas (COOPER, 2000).

LUMBIKANONDA; SAMMONS (2001) demonstraram que mesmo em superfícies rugosas, tendo estas diferentes tipos de tratamentos, ocorrerão diferentes tipos de respostas celulares. Embora, como já citado, todas terão efeitos osteogênicos.

Segundo os autores supra citados, fatores como profundidade dos poros e energia superficial, irão influenciar diretamente na adsorção de proteínas.

Uma rugosidade superficial com valor entre 1.0 a 2.0 μm tem obtido as melhores respostas clínicas, segundo ALBREKTSSON; WENNERBERG (2004 [a]). Todavia, COOPER (2000) observa que *in vivo*, o efeito da topografia em relação às populações de células aderentes possui uma grande diversidade de respostas. E que as atividades destas diferentes morfologias e topografias em relação a resposta biológica ainda estão para ser elucidadas. SADER et al. (2005) concordam, e observam que a microtopografia ideal ainda é desconhecida, devido a outros fatores associados a esta como por exemplo o óxido de titânio e sua associação com os resultados clínicos. O que se têm observado é que a célula deva contactar uma superfície que lembre o seu ambiente natural; e diferenças topográficas irão definitivamente alterar a maneira como esta irá interagir com o biomaterial (SCHWARTZ et al. , 1999). Segundo BOYAN et al., (2003) as superfícies rugosas tendem a promover uma melhor diferenciação osteoblástica em relação às lisas. A microtopografia parece contribuir na produção das integrinas (sinalizadores celulares) de células com características osteoblásticas *in vitro*. Sugere-se que um dos fatores relacionados seja uma maior energia superficial (BOYAN et al., 2003).

Segundo SAMMONS et al. (2005) a energia de superfície em implantes dentais pode ser responsável por influenciar a adsorção de proteínas como a vitronectina e a fibronectina facilitando a ligação de sinalizadores à superfície do implante. Com a adesão celular mediada por fatores hormonais, o osteoblasto pode então ter condições de dar seqüência à expressão do fenótipo.

Após a diferenciação, através da atuação de TGF- β 1 e PGE₂ (Prostaglandina E₂) deve ocorrer o aumento na produção e atividade de ALP (Fosfatase Alcalina). Tornando o ambiente desta forma com características osteogênicas (BOYAN et al., 2003).

ALBREKTSSON; WENNERBERG (2004[a]), qualificam as superfícies em relação às [1] propriedades mecânicas, [2] propriedades da topografia e [3] propriedades físico-químicas.

As propriedades mecânicas estão relacionadas à capacidade das superfícies resistirem aos potenciais das tensões. Uma deformação plástica pode concentrar tensões residuais na superfície levando a um aumento no potencial de corrosão. Em relação aos implantes dentais estes são artefatos com pequena dimensão e capazes de suportar altas componentes tensionais (HANSSON, 2000; NIZNICK, 2000).

Mudanças no atrito e rigidez podem ser otimizadas com o revestimento da superfície ou utilização de íons (WENNERBERG, 1996).

A importância da topografia está relacionada ao grau de rugosidade da superfície e orientação das irregularidades.

As respostas celulares em relação à morfologia, proliferação e adesão podem ser influenciadas tanto pela nano-topografia, micro-topografia como pela interação entre elas (ZINGER et al., 2003).

Durante muitos anos o implante maquinado de Brånemark (Nobelpharma) com um valor R_a entre 0.5 e 1.0 μm foi tido como “padrão ouro” (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004[a]). Todavia nos Anos 90 evidências científicas apontaram em outra direção. Implantes com R_a em torno de 1,5 μm mostraram uma resistência muito superior em relação à interface osso-implante (WENNERBERG, 1996).

As características físicas se referem a fatores como a energia de superfície. Em outras palavras um implante com alta energia superficial pode, de forma teórica, promover uma osseointegração com uma interface mais resistente (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004 [a]), embora alguns estudos discordem destas observações (SADER et al, 2005).

A composição química irá depender dos cuidados com descontaminação da superfície (BAIER et al, 1988 ; WENNERBERG, 1996), da camada de óxido (KASEMO; LAUSMAA, 1994) e do grau de corrosão do metal e liberação de íons (WENNERBERG, A., 1996). Em relação às impurezas encontradas nas superfícies, estas são comuns, e estão relacionadas ao meio ambiente (ar) entre outras, sendo sempre encontradas (KASEMO; LAUSMAA, 1994). Outros fatores relacionados com a química da superfície seriam modificações com a proposta de torná-las bioativas (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2005) adicionando fatores osteogênicos, osseointutores, osseocondutores ou osseopromotores.

2.3 A OSSEOINTEGRAÇÃO

No caso dos implantes dentais, após o preparo do leito cirúrgico este funcionará como uma fratura e deverá ser reparado como tal (SCHWARTZ et al., 1999), proporcionando um ambiente compatível para a formação da interface (KASEMO.; LAUSMAA, 1994). Desde que o trauma não supere a capacidade reparadora do osso o que se observará será um aumento na densidade óssea local após o período de cicatrização (SLOTTE et al, 2003).

A formação desta interface dependerá de uma série de eventos em cadeia como adesão, proliferação e diferenciação dos osteoblastos (POSTIGLIONE et al., 2003). Tratam-se de eventos que ocorrerão através de complexas interações fisiológicas entre o titânio e o sítio operado, muitos deles ainda por se estudar. Porém, três fatos estão claros em relação a uma satisfatória cicatrização pós-cirúrgica: [1] incisões e técnicas cirúrgicas apuradas; [2] cascata de coagulação sanguínea e [3] qualidade óssea (BRUNSKI, 1999). Sendo esta última questionada por alguns autores (JAFFIN; BERMAN , 1991; BAHAT, 2000).

ABRAHAMSSON et al (2004) realizaram um estudo comparativo *in vivo* em relação à formação óssea após a instalação de implantes osseointegrados com superfícies rugosas (SLA – ITI Dental Implant System – Institut Straumann AG, Basel, Switzerland) e lisas (Experimental – ITI Dental Implant System – Institut Straumann AG, Basel, Switzerland).

Os seguintes eventos foram descritos:

1. 2 h (após a instalação da fixação) -: Presença de eritrócitos retidos em uma densa rede de fibrina e remanescentes ósseos do leito preparado;

2. 4° Dia -: O coágulo na região começa a ser invadido por estruturas vasculares e células com características fibroblásticas formando um tecido de aspecto granular (tecido de granulação) e vários eritrócitos ainda aderidos ao implante. É notada a presença de polimorfos nucleares neutrófilos (PMN).

Macrófagos e monócitos estão presentes e relacionados com o processo de “limpeza” da área.

Os remanescentes ósseos depositados sobre o implante começam a ser reabsorvidos através de osteoclastos. Estas células também são encontradas na área óssea relacionada às perfurações.

Na superfície rugosa já se observa uma linha de células com características fibroblásticas de origem mesenquimal orientadas paralelamente ao implante;

3. 1ª Semana -: A formação de osso primário (osteóide) é iniciada em ambas as superfícies.

Na superfície lisa a formação óssea parece ser uma extensão do osso pré-cortado através de aposição (crescimento aposicional), penetrada por vários níveis de matriz conjuntiva provisória rica em estruturas vasculares.

Ocasionalmente remanescentes de coágulo são encontrados, e já se observam várias camadas densas de células com características osteoblásticas na periferia do tecido.

Todavia na superfície rugosa uma larga aposição de tecido ósseo neoformado é encontrada em contato direto com a fixação (ósteons primários), com estruturas trabeculares e vasculares evidentes. Uma remodelação já é observada através de linhas reversas nas áreas próximas;

4. 2ª Semana -: Uma grande quantidade de osso neo-formado é encontrada em ambas as superfícies, porém em contato com o implante rugoso a mineralização é notada com maior intensidade;

5. 4ª Semana -: Já é notada uma aposição de novo osso sobre o osso lamelar e uma interface em funcionamento. É difícil a diferenciação do osso da região de corte e sobre o implante.

Uma nova camada de osteóide é encontrada intimamente ligada à superfície rugosa.

Observam-se atividades fisiológicas e remodelação em todas as regiões;

6. 6ª Semana / 8ª Semana-: O tecido mineralizado é encontrado em superfícies rugosas e lisas, com cada vez menores diferenças. Áreas de mineralização, embora de maneira sutil, parecem ocorrer mais intensamente nas superfícies rugosas;

7. 8ª à 12ª Semana-: Não há diferenciação entre superfície lisa ou rugosa em relação a interface osso-implante;

Estes autores concluíram que superfícies rugosas parecem promover um resultado melhor em tempo e extensão da osseointegração, porém nas primeiras 2 semanas as unidades de mineralização são mais evidentes nas superfícies lisas.

Teorias sugerem que as propriedades de superfície (molhabilidade, microestrutura e composição química) tendem a facilitar o reparo tecidual (WENNERBERG, 1996; BOYAN et al., 2003; KENNEDY et al., 2006).

2.4 INTERAÇÃO CÉLULA / BIOMATERIAL. A ADESÃO CELULAR AOS IMPLANTES OSTEOINTEGRÁVEIS

Uma vez em contato com a superfície do implante células osteoblásticas tendem a promover uma adesão que dará continuidade a uma série de eventos e farão a modificação da interface (SCHWARTZ et al. 1999).

RAJARAMAN et al. (1974) caracterizam a adesão celular em 04 estágios: [1] início de mudanças no citoesqueleto através de pequenos filópodes; [2] extensões citoplasmáticas através de lamelópodes (*cytoplasmic webbing*); [3] espraiamento circunferencial; [4] total espraiamento e planificação na forma poligonal (figura 6, página 47).

A “adesão” sobre biomateriais é precedida por vários fenômenos. Em relação aos implantes dentários, o contato inicial ocorre rapidamente e envolve eventos de ordem físico-química entre células e material, como forças iônicas, forças de van der Waals entre outras. A adesão propriamente dita envolverá processos de ordem molecular mais complexos na interação implante / matriz extracelular. As moléculas de adesão tem a propriedade de interagir com específicas estruturas (*ligands*), que podem estar situadas nas membranas das células vizinhas (contato célula-célula) ou na própria matriz.

As moléculas de adesão pertencem a diferentes famílias. As quatro maiores classes são as selectinas, super família das imunoglobulinas, caderinas e integrinas. Em relação aos osteoblastos as caderinas e integrinas desenvolvem um importante papel. Estas moléculas são sinalizadoras de proteínas relacionadas a adesão, como por exemplo a fibronectina (ANSELME, 2000).

O sucesso dos implantes dentários dependerá então da eficiência e estabilidade das interações entre as células ósseas (osteoblastos) e o titânio, onde a qualidade da adesão celular e a matriz depositada na superfície determinarão a integração tecidual e formação da interface (ANSELME, 2000). Ainda importante, é observar que diferenças nas propriedades de superfície dos materiais podem ter

profundos efeitos na adesão de proteínas e conseqüente junção celular (MEYER et al., 2005).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

“Analisar as propriedades físico-químicas de duas superfícies de implantes osteointegráveis de uso odontológico e a adesão de células do estroma da medula óssea humana sobre estas.”

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar qualitativamente a topografia e a composição química de dois tipos de superfícies de implantes de titânio (maquinadas – Mq e tratadas – ST);

2. Analisar quantitativamente a topografia de dois tipos de superfícies de implantes de titânio (Mq e ST) através da mensuração da rugosidade média (Ra) das distintas superfícies;

3. Analisar quantitativamente a molhabilidade de dois tipos de superfícies de implantes de titânio (Mq e ST);

4. Analisar qualitativamente e quantitativamente a adesão de células do estroma da medula óssea humana sobre dois tipos de superfície de implantes de titânio (Mq e ST).

HIPÓTESES

4 HIPÓTESES

H.1. A superfície Mq apresenta maior número de contaminantes e a ST apresenta menor número de contaminantes.

H.2. A superfície ST apresenta maior número de contaminantes e a Mq apresenta menor número de contaminantes.

H.3. Ambas as superfícies apresentam um baixo nível de contaminantes.

H.4. Ambas as superfícies apresentam um alto nível de contaminantes.

H.5. A superfície Mq apresenta uma baixa rugosidade média e a ST uma alta rugosidade média;

H.6. A superfície Mq apresenta uma alta rugosidade média e a ST uma baixa rugosidade média;

H.7. Ambas as superfícies apresentam uma baixa rugosidade média;

H.8. Ambas as superfícies apresentam uma alta rugosidade média;

H.9. A superfície Mq apresenta alta molhabilidade e a ST baixa molhabilidade.

H.10. A superfície Mq apresenta baixa molhabilidade e a ST alta molhabilidade.

H.11. Ambas as superfícies apresentam alta molhabilidade.

H.12. Ambas as superfícies apresentam baixa molhabilidade.

H.13. As células estromais aderem às superfícies Mq e não aderem às superfícies ST.

H.14. As células estromais aderem às superfícies ST e não aderem às superfícies Mq.

H.15. As células estromais aderem às superfícies Mq e ST.

H.16. As células estromais não aderem às superfícies Mq e ST.

MATERIAIS E MÉTODOS

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA

Os corpos de prova utilizados para análise topográfica e química, medição do ângulo de contato e cultivo de células, foram fabricados e fornecidos pela empresa Neodent Implante Osteointegrável (Curitiba, PR, Brasil), bem como os dados relacionados a estes (tabela 2, página 76).

As amostras apresentavam-se embaladas e esterilizadas em óxido de etileno pela empresa fornecedora.

Foram confeccionados 58 discos (29 Mq e 29 ST) (tabela 2) de liga de titânio grau II (ASTMF67) com 3,0 mm de diâmetro e 01 mm de espessura, obtidos de uma barra original com 3,18 mm. Vinte e nove discos sofreram usinagem para a obtenção de uma superfície maquinada (Mq) e os outros vinte e nove receberam tratamento de superfície através de subtração ácida (nomenclatura e informação fornecida pela empresa), gerando uma superfície tratada (ST) (Neodent Implante Osteointegrável, Curitiba, PR, Brasil). Utilizou-se ainda um (01) implante tratado (ST) (tabela 2) com diâmetro de 4.0 mm e altura de 9.0 mm para análise qualitativa da macro e microestrutura. Este implante recebeu o mesmo tratamento de superfície que os discos tratados e foi cedido na forma comercial (embalagem). A empresa restringiu-se a não fornecer quaisquer outros dados sobre o processo de tratamento das superfícies por tratar-se de segredo de indústria.

5.1.1 Corpos de prova

5.1.1.1 Análise da macro e microestrutura das superfícies

Quatorze (14) discos de titânio (07 Mq e 07 ST) e um (01) implante ST (tabela 3, página 78). Os corpos de prova foram distribuídos da seguinte maneira:

O implante foi analisado qualitativamente ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL JSM 6460 LV, Tokyo, Japan) nos terços médio e apical, utilizando-se magnificações de 10X (corpo), 37X (ápice) e 5.000 vezes (roscas).

Doze (12) discos (06 Mq e 06 ST) sofreram análise qualitativa da topografia e química (MEV/EDS), e não passaram pelo processo de metalização. Suas magnificações foram realizadas em 500X, 3000X e 10000 vezes. Da mesma forma estes espécimes foram analisados pela sonda NORAN (NORAN, Tokyo, Japan) acoplada ao MEV, através da espectroscopia de energia dispersiva (EDS), para análise de traços de contaminantes, como por exemplo, o vanádio.

Dois (02) discos (01 Mq e 01 ST) foram utilizados para a análise quantitativa da rugosidade média ao perfilômetro de contato.

5.1.1.2 Análise dos ângulos de contato (molhabilidade)

Vinte (20) discos (10 Mq e 10 ST) (tabela 3, página 78).

Os corpos de prova foram levados ao goniômetro (S.E.O. Phoenix 300 – Surface Electro Optics, Swon-si, Gyeonggi-do, Korea) e analisados ao *software* DROImage® (Oslo University, Oslo, Norway).

Cinco (05) discos Mq e cinco (05) discos ST foram analisados ao líquido medidor água deionizada.

Cinco (05) discos Mq e cinco (05) discos ST foram analisados ao líquido medidor glicerol.

A possibilidade da utilização de um terceiro líquido medidor como o di-iodo-metano foi descartada devido à sua toxicidade.

5.1.1.3 Análise de adesão

Vinte e quatro (24) discos (12 Mq e 12 ST) (tabela 3).

As amostras com células aderidas foram metalizadas (Metalizador SCD050 Sputter Coater – BALTEC AG, Liechtenstein) com ouro e submetidos ao exame de

varredura (MEV). Para tal foram utilizadas as seguintes magnificações: 33X, 300X e 500 vezes em vários pontos da superfície.

5.2 ARMAZENAGEM

As amostras utilizadas para avaliação dos ângulos de contato e análise topográfica e química foram tratadas com equipamentos de proteção individual (gorros, máscaras e luvas e pinças estéreis).

As amostras utilizadas para análise de adesão de células estromais foram armazenadas em bandeja de aço inox (Quinelato – Schobel Industrial, Rio Claro, SP, Brasil) esterilizadas em autoclave (Tuttnauer – Alfa Medical, Hempstead, NY, USA). Os corpos de prova apresentavam-se embalados individualmente como recebidos da empresa a uma temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ (Centro de Pesquisa em Terapia Celular e Bioengenharia Ortopédica – CTCel, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia – INTO, Rio de Janeiro, Brasil).

Tabela 2 – Apresentação dos dados relacionados aos corpos de prova

| | Dimensões | Composição (ASTMF) | Tratamento | Esterilização | Total UN |
|-----------------|-------------|--------------------|------------|---------------------|-------------|
| Discos Ø | | | | | |
| Maquinados | 3.0 mm | Titânio Grau II | Usinagem | Óxido de Etileno | 29 |
| Tratados | 3.0 mm | Titânio Grau II | N/I | | 29 |
| Implante | | | | | |
| | 4.0 mm Ø | | | Óxido | |
| | X | Titânio | N/I | de Etileno | 01 |
| | 9.0 mm | Grau II | | | |
| | Comprimento | | | | |

N/I – Não informado

UN – Unidade

5.3 ANÁLISES TOPOGRÁFICA E QUÍMICA DAS SUPERFÍCIES MAQUINADAS (Mq) E TRATADAS (ST)

A microscopia eletrônica de varredura, a análise de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e a perfilometria foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LABMIC) da Escola Politécnica de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE/UFRJ).

Para a análise qualitativa da topografia foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura. A análise química foi realizada através da espectroscopia de energia dispersiva. Foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL JSM 6460 LV, Tokyo, Japan) com uma sonda EDS acoplada (NORAN, Tokyo, Japan).

Trata-se de um equipamento semi-ambiental, e permite procedimentos de alto, médio e baixo vácuo.

O implante e os espécimes em forma de discos foram varridos ao MEV a uma quilovontagem (kV) de 20kV, em uma escala de 5 a 40 kV (CALLISTER, 2000; KAHN, 2007).

A análise quantitativa dos discos de titânio foi realizada através do perfilômetro de contato (Taylor Hobson, Leicester, UK). Este equipamento utilizou uma ponta de diamante de 0,02 μm que escaneou uma área de 50 μm^2 da superfície de cada um dos discos com uma resistência de aproximadamente 0,5 μN , no sentido centro/periferia; realizando a medição da rugosidade média (R_a) em uma escala nanométrica, sendo esta posteriormente convertida para micrometros. A análise ao perfilômetro é melhorada ainda com a utilização de um filtro de Gauss (80 μm), que retira a característica de ondulações comuns as superfícies rugosas.

Define-se como rugosidade média (R_a) a média aritmética entre picos e vales de uma superfície (SADER, et al. 2005).

5.4 MEDIÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO

As medições dos ângulos de contato foram realizadas no Laboratório de Revestimentos Protetores e Materiais Nanoestruturados, do Departamento de Física da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ).

Os espécimes em forma de discos (10 Mq e 10 ST) (tabela 3) foram levados ao goniômetro S.E.O. Phoenix 300 (Surface Electro Optics, Suwon-si, Gyeonggi-do,

Korea), para a medição dos ângulos de contato. Este aparelho possui uma base móvel onde os corpos de prova são colocados e é gotejado um líquido com tensão superficial conhecida. Em nosso estudo foram obtidas vinte medidas em cada espécime, sendo dez para o líquido medidor água deionizada e dez para o líquido medidor glicerol.

Tabela 3 – Divisão dos Corpos de Prova

| | Análise Topográfica (Qualitativa) e Química (MEV/EDS) | Rugosidade Média (R_a) (Perfilômetro) | Ângulo de Contato (Goniômetro) | Adesão e Contagem de Células (MEV) |
|-----------------|--|--|---|---|
| Implante | 01 | | - | - |
| Disco Mq | 06 | 01 | 10 | 12 |
| Disco ST | 06 | 01 | 10 | 12 |
| Total | 13 | 02 | 20 | 24 |

Sobre cada espécime foi gotejado um volume padronizado em 03 microlitros (μl).

A padronização foi realizada através de um suporte do aparelho, onde seringas descartáveis de 3 ml com os líquidos medidores foram montadas antes das medidas. Desta forma a gota era produzida automaticamente após acionado o comando do *software* assim que o corpo de prova era posicionado abaixo da agulha da seringa. As agulhas não eram biseladas, sendo todas de pontas retas. Os líquidos não foram trocados durante o decorrer do experimento.

A gota de cada experimento foi captada através de uma câmera de captura, e a imagem de cada espécime projetada em um monitor. As imagens foram analisadas através do *software* DROPIImage® (Oslo University, Oslo, Norway), onde foram medidos os limites e interseções sólido/líquido, líquido/ar e sólido/ar. Este *software* realiza os cálculos pelo método Young-Laplace.

Após a obtenção de uma imagem de ótimo contraste e qualidade do corpo de prova, era dado o comando para a produção de 3 μl do líquido medidor. Este então

era gotejado sobre o espécime. Imediatamente após dava-se o comando de captura da imagem, e então o *software* analisava e calculava os ângulos de contato, que eram salvos no *hard disk* do computador.

Os ângulos eram registrados pelo programa somente depois de perfeita calibragem do equipamento e um excelente *baseline*.

5.5 TESTE DE ADESÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS

Foram utilizados 24 discos, sendo 12 Mq e 12 ST (tabela 3), portanto o experimento prévio foi realizado 02 vezes (01 hora e 18 horas). Entretanto os experimentos da primeira hora foram descartados por não apresentarem-se qualitativamente significantes. Sendo mantidos apenas os resultados da décima oitava hora.

5.5.1 Obtenção de células do estroma da medula óssea humana

As células do estroma da medula óssea utilizadas nos experimentos foram obtidas do raspado medular e osso esponjoso de pacientes saudáveis de ambos os sexos, com idades entre 20 e 50 anos e sorologia negativa para os marcadores de hepatite B e C, e HIV. Os pacientes sofreram artroplastia total de quadril, mas não apresentavam doenças osteometabólicas. O material biológico foi obtido de acordo com o protocolo aprovado pelo CEP-INTO (Comitê de Ética em Pesquisa – INTO), sob o número de protocolo 092.

O protocolo de cultura celular seguiu o experimento prévio realizado por SADER et al (2005).

O material medular obtido durante o procedimento cirúrgico foi acondicionado de forma estéril em tubos Falcon e transportados a 4°C do centro cirúrgico ao laboratório de pesquisa (CTCel), localizado no mesmo complexo hospitalar.

No CTCel este material foi ressuspenso em salina livre de cálcio e magnésio e homogeneizado em meio de cultura DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium* (PerBio Science Company, Helsingborg, Sweden) suplementado com soro fetal bovino (CULTILAB – Campinas, SP, Brasil) e antibiótico CIPRO (Ciprofloxacina - Bayer Health Care Pharmaceuticals, Wayne, NJ, USA). A finalidade deste procedimento é a dissolução dos grumos de células (*pellet*) (figura 13, página 81). Em seguida foram colocados em repouso para sedimentação das espículas ósseas.

Após trinta segundos, a porção sobrenadante foi recolhida e transferida para outro tubo. Este processo foi repetido 5 vezes em cabine de fluxo laminar (TROX Technoc – Curitiba, PR, Brasil). As suspensões celulares foram levadas a centrifugação (Excelsa 4 Mod 280R– FANEN, São Paulo, SP, Brasil) e o sobrenadante descartado. Após este procedimento as células foram contadas na câmara de Neubauer (figura 14, página 82) em microscópio invertido (NIKON Eclipse 100, Nikon, Tokyo, Japan). Após a contagem foi selecionada uma concentração de $1,2 \times 10^5$ células/mm². Esta concentração foi então plaqueada através do gotejamento de 3 µl sobre os espécimes em forma de discos.

Observar que as células sobre os discos não correspondem a mesma concentração selecionada devido a área total destes, visto que a concentração é obtida previamente nas garrafas de cultura, e a área dos discos correspondem a 7.0 mm²/disco.

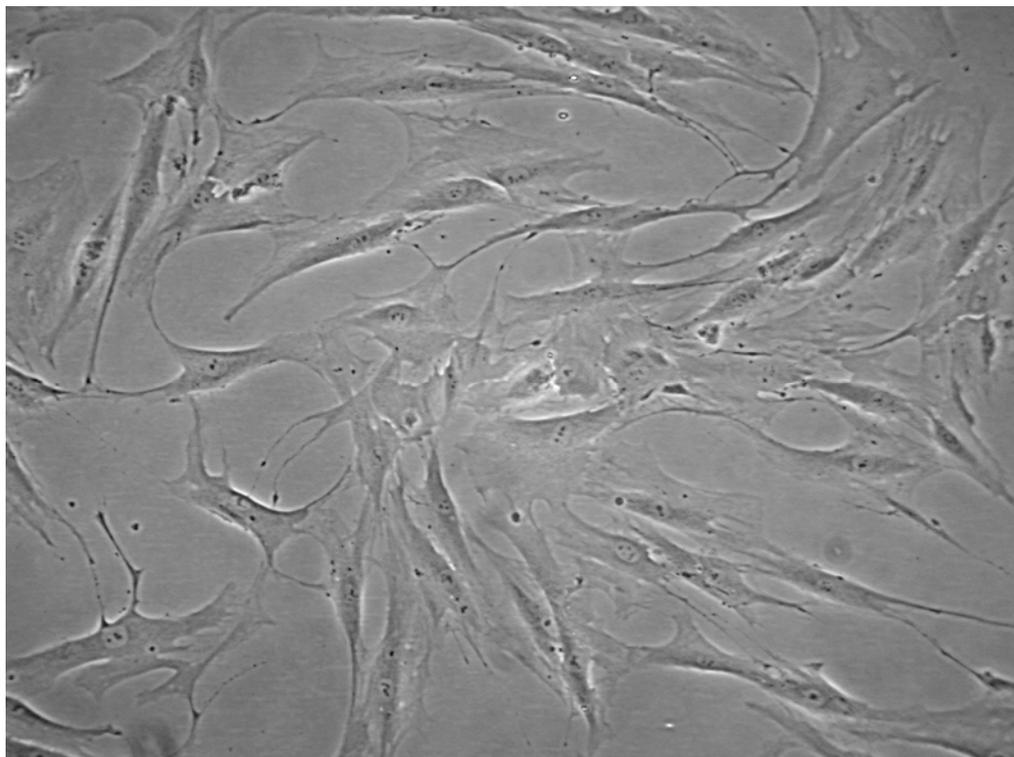


Figura 12 – Figura demonstrativa da morfologia fusiforme da população de células estromais aderidas ao plástico (garrafa de cultura) observadas ao microscópio invertido (NIKON Eclipse 100, Tokyo, Japan).

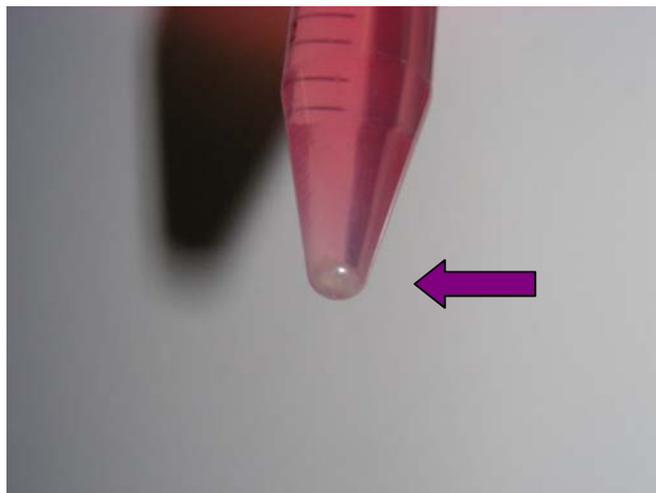


Figura 13 – Figura demonstrando o *pellet* (grumos) aderido ao tubo Falcon, após a centrifugação.

5.5.2 Contagem de células

Para a contagem das células aderidas utilizou-se as imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura por análise de retroespalhamento. Os discos foram incubados com DMEM 10% por 10 minutos. O meio foi removido e em seguida $1,2 \times 10^5$ células por mm^2 (figura 15) foram plaqueadas em 20 μL de DMEM 10%, e incubadas em estufa úmida. Após 2 horas de incubação os discos foram recobertos com o mesmo meio de cultura e incubados por 18 horas.

Seguido o período de incubação, as células foram fixadas em glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4. Posteriormente foram lavados no mesmo tampão e em seguida pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio e desidratados em concentrações crescentes de etanol, seguido de incubação em hexametil disilano (HMDS). As amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro e examinadas ao MEV a uma voltagem de aceleração de 15 Kv.

As contagens das células sobre as superfícies Mq e ST foram realizadas em 06 corpos de prova (03 Mq e 03 ST). Cada imagem foi dividida em 56 quadrantes de $0,018 \text{ mm}^2$, sendo selecionados 12 quadrantes aleatoriamente. O número de células presentes em cada um dos 12 quadrantes foi quantificado por 02 observadores independentes (duplo cego). A média do número de células por quadrante, assim como o desvio padrão foram expressos em número de células/quadrante (Apêndice A).

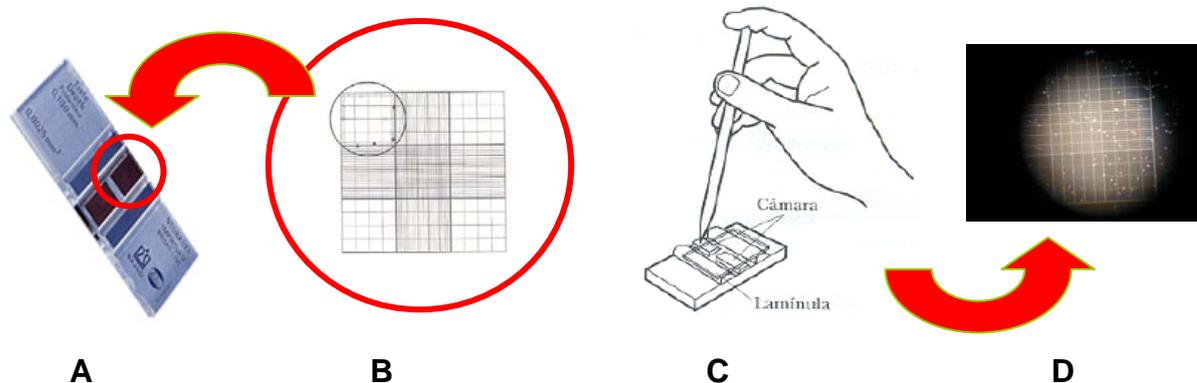


Figura 14 – Figura ilustrativa da câmara de Neubauer utilizada na contagem de células durante o procedimento de cultura.

A – A câmara de Neubauer.

B – Aumento para visualização da área destinada a contagem. Esta contagem é realizada escolhendo-se aleatoriamente um dos quadrantes (total de 04) da câmara. Notar círculo demarcando o quadrante 1.

C – A lamínula é colocada sobre a câmara e levada ao microscópio invertido para a contagem.

D – Imagem obtida ao microscópio invertido (NIKON Eclipse 100, Tokyo, Japan).

Fonte: <http://www.icb.usp.br/~bmm/materiais/P3a%20%20Contagem%20de%20celulas%20em%20camara%20de%20Neubauer.pdf> (B e C)

<http://www.labex.com.br/site/produtos.php?ln=pt&menu=5&id=22> (A)



Figura 15 – Figura demonstrativa do plaqueamento dos discos em cabine de fluxo laminar para análise de adesão.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.6.1 Rugosidade média (R_a)

A análise estatística dos dados da rugosidade média (R_a) obtidos através do perfilômetro foi realizada através do teste de Wilcoxon, de acordo com o valor da média, desvio padrão e erro padrão obtidos. Admitindo-se um grau de significância de $p < 0,05$.

O teste de Wilcoxon é um teste não paramétrico para a comparação de duas amostras pareadas. A princípio são calculados os valores numéricos da diferença entre cada par, sendo possíveis três condições: aumento (+), diminuição (-) ou igualdade (=). Uma vez calculadas todas as diferenças entre os valores obtidos para cada par de dados estas diferenças são ordenadas pelos seus valores absolutos (sem considerar o sinal), substituindo-se então os valores originais pelo posto que ocupem na escala ordenada. O teste da hipótese de igualdade entre os grupos é baseado na soma dos postos das diferenças negativas e positivas (LELES, 2001).

5.6.2 Ângulo de contato

A análise estatística dos dados armazenados através dos resultados ao goniômetro foi realizada através do teste paramétrico ANOVA (variância), para avaliação da curva de Gauss. De acordo com o grau de liberdade, o erro padrão e o desvio padrão.

A análise de variância é um teste estatístico indicado para a comparação de 03 ou mais grupos de dados numéricos em distribuição normal ou aproximadamente normal (LELES, 2001).

O teste mostrou se houve ou não significância entre os resultados.

O Teste de múltiplas comparações de Tukey, avaliou as diferenças entre os grupos, admitindo-se um grau de significância de $p < 0,001$ para as pequenas e $p < 0,05$ para as maiores.

O teste de Tukey é utilizado em comparações aos pares, porém permite a comparação de todos os pares de médias isoladamente. É fornecido um valor crítico e a diferença entre as médias dos grupos comparadas e consideradas significantes quando excedem este valor crítico (LELES, 2001).

5.6.3 Contagem de células

A análise estatística dos dados armazenados através dos resultados obtidos ao MEV foi realizada através do teste de Mann Whitney que avaliou as diferenças entre os grupos, admitindo-se um grau de significância de $p < 0,05$.

O teste de Mann Whitney é um teste indicado para a comparação de dois grupos não pareados cujos requisitos para a aplicação do teste t de Student não foram cumpridos. Este teste avalia a igualdade entre as medianas (LELES, 2001).

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE TOPOGRÁFICA E QUÍMICA DAS SUPERFÍCIES MAQUINADAS E TRATADAS

6.1.1 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS)

Ao MEV foram avaliados qualitativamente um implante de superfície ST e 12 discos de titânio (06 Mq e 06 ST).

As superfícies do implante e dos discos ST, segundo especificação do fabricante, foram tratadas por subtração ácida (não divulgado o método) e confeccionada em liga de titânio grau II (ASTMF67).

O implante mostrou sensíveis diferenças em relação a análise qualitativa da superfície. Enquanto na região das roscas apresentou uma homogeneidade na rugosidade a uma magnificação de 5.000 vezes (figura 16 B), o mesmo não aconteceu na região apical ao mesmo aumento (figura 16D). Que demonstrou uma rugosidade diferenciada com um aspecto de “lascas”.

A análise qualitativa das superfícies dos discos Mq (figuras 20 A/B/C), demonstrou a formação de ranhuras condizentes com o processo de usinagem (setas brancas) a magnificações de 500X, 3.000X e 10.000 vezes. Observamos ainda a presença de imperfeições ao redor dos sulcos, sugestivas de cavacos de usinagem (setas azuis).

A análise qualitativa das superfícies dos discos ST (figura 16) demonstrou uma rugosidade padrão e bem definida a magnificações de 500X, 3.000X e 10.000 vezes.

Uma sonda EDS foi utilizada para a análise química das superfícies. Os discos Mq (figura 18) e ST (figura 19), assim como o implante avaliado (figura 17) apresentaram altas concentrações de titânio além de não apresentarem quantidades significantes de contaminantes.

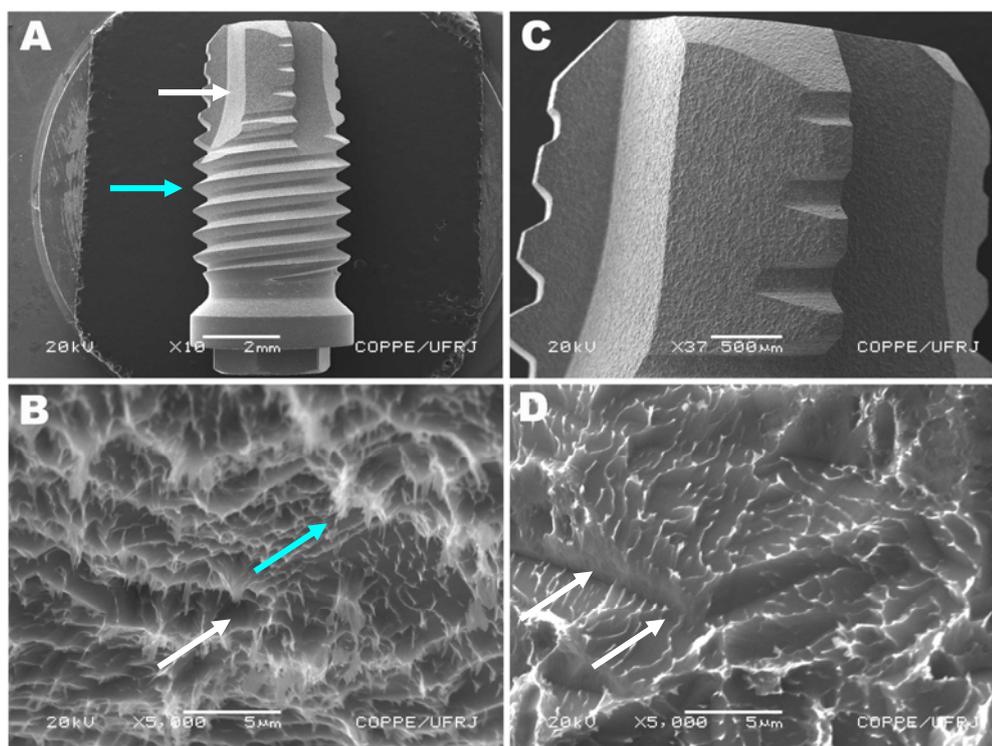


Figura 16 – Figura representativa da microscopia eletrônica de varredura de implante $\varnothing 4.0 \times 9$ Titamax Ti cortical (Neodent Implante Osteointegrável, Curitiba, PR)

A – Observar aspecto cilíndrico do implante de conexão externa hexagonal e superfície tratada, provido de roscas de seção triangular (seta azul) com profundidade de 0.35 mm (figura 10, página 59) e macho de rosca no ápice (seta branca) a uma magnificação de 10X (MEV) e voltagem de aceleração de 20.0 kV.

B – Aspecto rugoso das roscas onde são observados picos (seta azul) e vales (seta branca), mostrando uma uniformidade do tratamento superficial, a uma magnificação 5000X (MEV) e voltagem de aceleração de 20.0 kV.

C – Ápice do implante. Esta região é provida do macho de rosca, o qual facilita a instalação do implante em regiões de alta densidade óssea. Magnificação 37X. Voltagem de aceleração de 20.0 kV.

D – Região do ápice do implante a uma magnificação de 5000X (voltagem de aceleração de 20.0 kV). Notar significativa diferença na morfologia desta região, onde a rugosidade parece não seguir um padrão linear (aspecto de “lascas”) como apresentado na região de roscas.

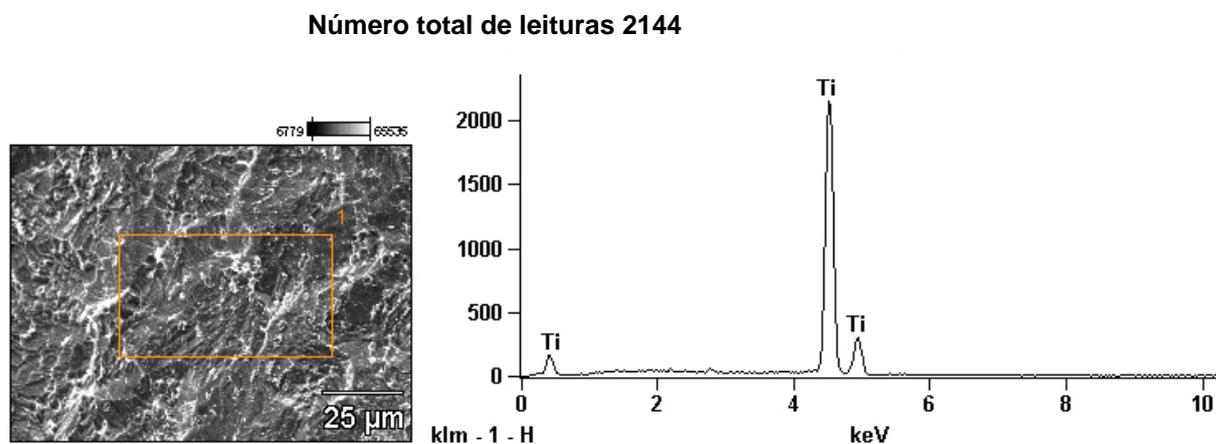


Figura 17 – Espectroscopia de energia dispersiva (Implante Titamax Ti 4.0X09 – Neodent Implante Osteointegrável – Curitiba – PR). Após uma leitura extensa (2144 vezes) sobre a área selecionada, a sonda NORAN (Tokyo, Japan) não mostrou traços contaminantes sobre o metal. Foi notada alta concentração de titânio.

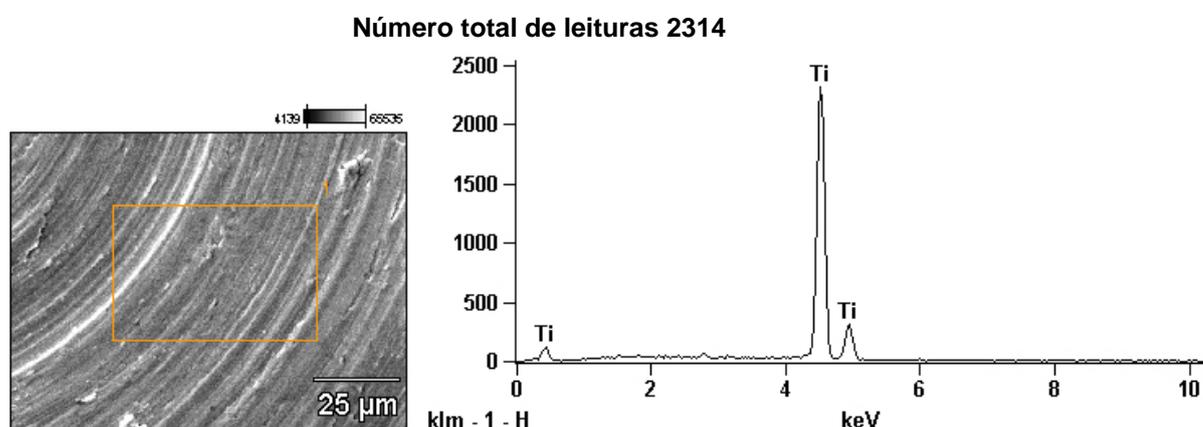


Figura 18 – Espectroscopia de energia dispersiva (disco de titânio maquinado. Neodent Implante Osteointegrável – Curitiba – PR). Após uma leitura extensa (2314 vezes) sobre a área selecionada, a sonda NORAN (Tokyo, Japan) não mostrou traços contaminantes sobre o metal. Foi notada alta concentração de titânio.

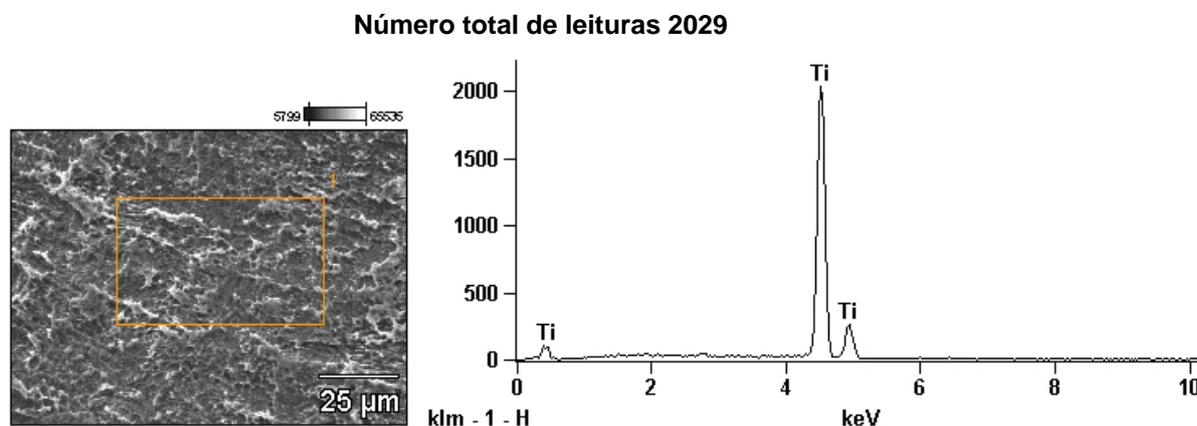


Figura 19 – Espectroscopia de energia dispersiva (disco de titânio tratado. Neodent Implante Osteointegrável – Curitiba – PR). Após uma leitura extensa (2029 vezes) sobre a área selecionada, a sonda NORAN (Tokyo, Japan) não mostrou traços contaminantes sobre o metal. Foi notada alta concentração de titânio.

6.1.2 Perfilometria

Apesar do grau de significância ($p < 0,05$) na diferença de rugosidades médias entre os corpos de prova (tabela 5), ambos apresentaram características de lisura em suas superfícies (THOMAS; COOK, 1985; GOLDHABER, 1996).

A rugosidade média do disco Mq ficou aproximadamente em 0,12 , enquanto o ST em 0,31 (figura 21, página 92).

Os dados relativos aos valores médios das rugosidades, seus devidos desvios padrão e erros padrão (Apêndice A) estão descritos na tabela 4.

Tabela 4 – Média , desvio padrão e erro padrão dos valores da rugosidade dos espécimes em forma de discos.

| | Perfil liso | Perfil rugoso |
|----------------------|--------------------|----------------------|
| Média | 1097 | 3144 |
| Desvio Padrão | 603,0 | 1309 |
| Erro Padrão | 227,9 | 494,6 |

O teste de Wilcoxon (Apêndice A) foi utilizado para a avaliação da significância do grau de rugosidade dos corpos de prova, admitindo um grau de significância de $p < 0,05$.

Tabela 5 – Teste de Wilcoxon aplicado à tabela 4

| | |
|-------------------|--------------|
| Valor de p | 0.0156 |
| | Significante |

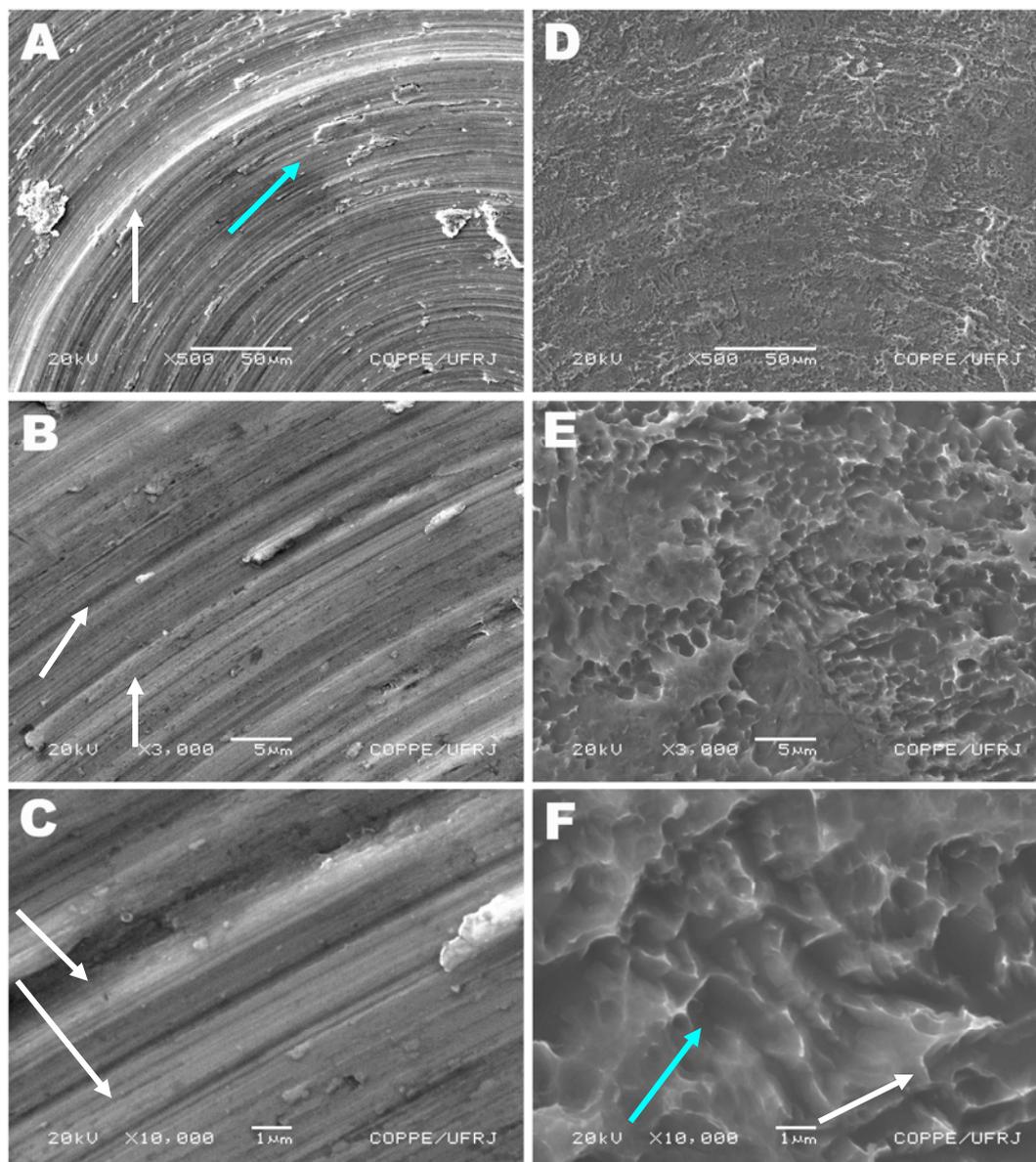


Figura 20 – Análise topográfica dos discos (MEV) – Qualitativa

Disco de titânio maquinado (A/B/C) / Disco de titânio tratado (D/E/F)

Voltagem de aceleração -: 20.0 kV

Magnificação -: 500X (A/D); 3000X (B/E); 10000 vezes (C/F)

A,B e C – A análise da morfologia do disco de titânio Mq mostrou ranhuras (figura A, seta branca) e imagem sugestiva de cavacos (figura A, seta azul) obtidos através do processo de usinagem. Observando as figuras B e C (setas brancas) nota-se a ausência de padrão na dimensão dos sulcos, embora estes pareçam ter uma ordenação concêntrica.

D,E,F – Os discos ST apresentaram um padrão de uniformidade em todas as magnificações. Nestes espécimes foram notadas imagens sugestivas de micro-picos ($\sim 1 \mu$) (figura F, seta branca) e vales (figura F, seta azul) que caracterizam as superfícies atacadas por ácidos.

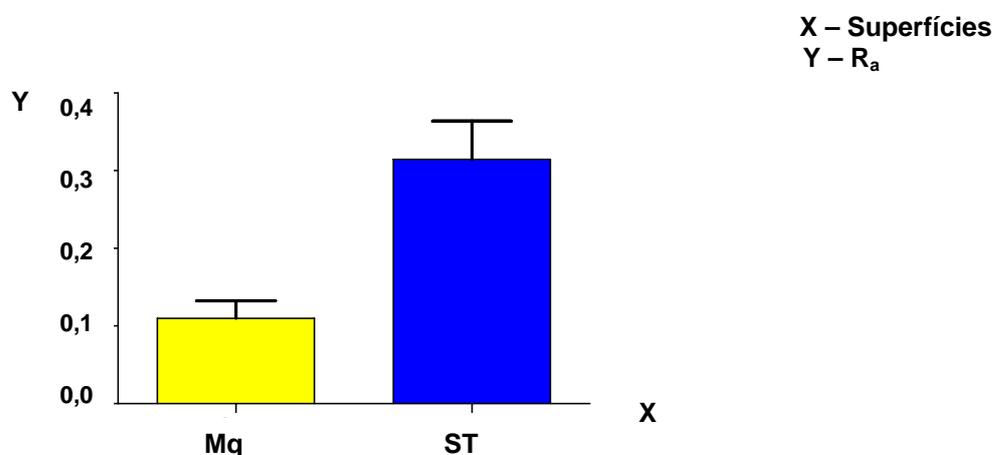


Figura 21 – Gráfico representativo da rugosidade superficial (R_a) e desvios padrão entre disco Mq e ST.

6.2 MEDIÇÃO DOS ÂNGULOS DE CONTATO

Os resultados apresentados para a avaliação da molhabilidade dos espécimes foram obtidos nos discos de titânio Mq (figuras 20 A/B/C) e ST (figuras 20 D/E/F) após medição do ângulo de contato com glicerol e água deionizada.

Ambas as superfícies mostraram-se hidrofílicas (GROESSNER-SCHREIBER et al., 2006), porém, o teste paramétrico de variância (ANOVA) (Apêndice A) mostrou um alto grau de significância ($p < 0.001$) (tabela 6) na diferença dos ângulos de contato entre elas, onde as ST apresentaram valores menores.

Os ângulos de contato para as superfícies Mq com glicerol variaram entre 46.77 e 112.6 com uma média de 79.04, e entre 20.62 e 122.3 para as superfícies ST, com uma média de 60.95.

Em relação as medições para a água deionizada os ângulos de contato variaram entre 49.36 e 116.9 para as superfícies Mq, com uma média de 76.16, e 43.78 e 60.92 para as ST, com uma média de 53.76.

Os dados relativos aos valores médios dos ângulos de contato, seus devidos desvios padrão e erros padrão (Apêndice A) estão descritos na tabela 6.

Tabela 6 – Média , desvio padrão e erro padrão dos valores dos ângulos de contato dos espécimes

| | Mq/G | ST/G | Mq/A | ST/A |
|----------------------|-------|-------|-------|--------|
| Média | 79,04 | 60,95 | 76,16 | 53,76 |
| Desvio Padrão | 15,06 | 19,27 | 13,49 | 4,166 |
| Erro Padrão | 1,978 | 2,371 | 1,967 | 0,7365 |

Mq/G – Superfície maquinada / Glicerol

Mq/A – Superfície maquinada / água deionizada

ST/G – Superfície tratada / Glicerol

ST/A – Superfície tratada / água deionizada

Tabela 7 – Valor de p, número de grupos e frequência aplicados à tabela 6 (ANOVA)

| ANOVA | Valor de P | Número de Grupos | Frequência |
|-------|------------|------------------|------------|
| | P<0,001 | 4 | 28,73 |

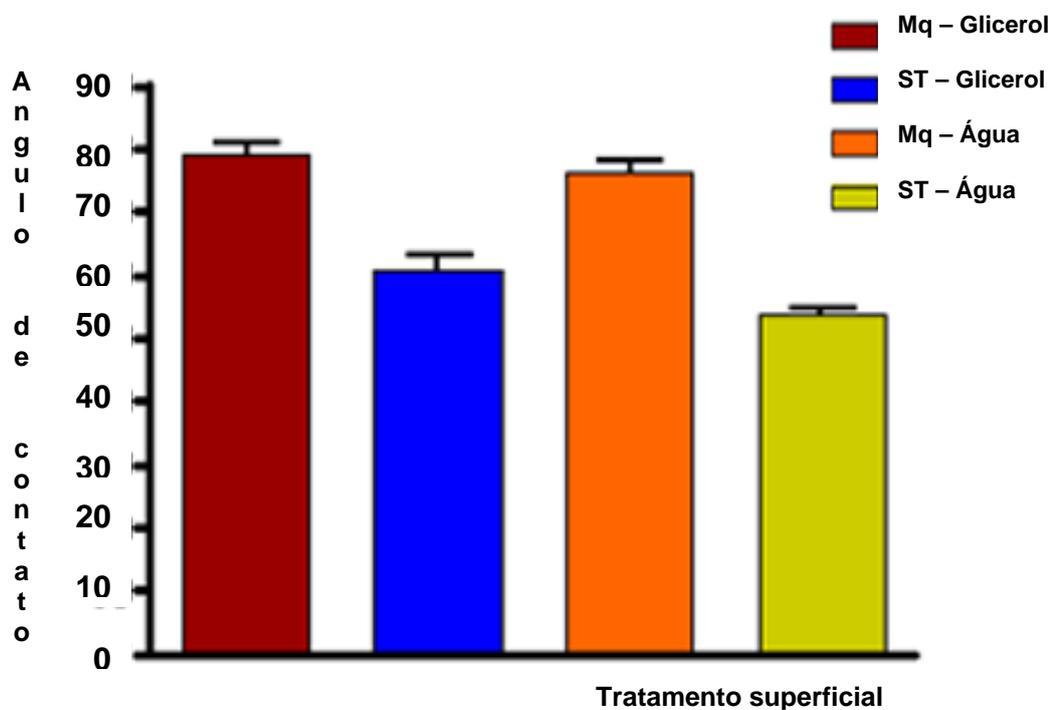


Figura 22 – Gráfico representativo dos ângulos de contato e desvios padrão em discos de titânio maquinados (Mq) e com tratamento superficial (ST).

Tabela 8 – Teste de Tukey aplicado aos valores do apêndice A (ANOVA) – maquinado (Mq) X tratado (ST)

| | Mq/G | Mq/G | Mq/G | ST/G | ST/G | Mq/A |
|------------------------|------------------|--------------------|------------------|----------------------|-------------------|------------------|
| | X | x | x | x | x | x |
| | ST/G | Mq/A | ST/A | Mq/A | ST/A | ST/A |
| Diferença entre médias | 18,08 | 2,879 | 25,28 | -15,20 | 7,191 | 22,40 |
| Quociente de Variação | 9,350 | 1,365 | 10,68 | 7,413 | 3,107 | 9,094 |
| valor de p | p<0,001 | p>0,05 | p<0,001 | p<0,001 | p>0,05 | p<0,001 |
| 95% de Confiabilidade | 10,96 a 25,21 | - 48,90 a 10,65 | 16,56 a 33,99 | - 22,76 a - 7,649 | -1,335 a 15,72 | 13,32 a 31,47 |

p<0,001 – Significante p>0,001 – Não significante

p<0,05 – Significante p>0,05 – Não significante

Mq/G – Superfície maquinada / glicerol

Mq/A – Superfície maquinada / água deionizada

ST/G – Superfície tratada / glicerol

ST/A – Superfície tratada / água deionizada

A análise de múltiplas comparações (Apêndice A), observada a figura 22 demonstrou alta significância nas diferenças da molhabilidade ($P<0.001$) quando confrontadas as superfícies Mq e ST frente ao glicerol; Mq com glicerol e ST com água deionizada; ST com glicerol e Mq com água deionizada; ST com água deionizada e Mq com água deionizada. Porém não apresentou significância ($p>0.05$) quando as duas superfícies foram confrontadas entre elas, tanto na água deionizada quanto no glicerol (tabela 6).

6.3 TESTE DE ADESÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS

As células estromais aderidas sobre os espécimes foram avaliadas pela microscopia eletrônica de varredura. Utilizaram-se ampliações de 33X (figuras 25 A/C), 300X (figuras 23 A/B) e 500 vezes (figuras 25 B/D) a uma voltagem de aceleração de 15 kV após 18 horas.

Nas superfícies Mq foram observadas células espalhadas de aspecto fusiforme, ordenando-se no sentido dos sulcos provocados pelo processo de

usinagem (figuras 23 A, 25 A/B). Em contrapartida, em superfícies ST foi notado menor espraioamento (23 B e 25 D).

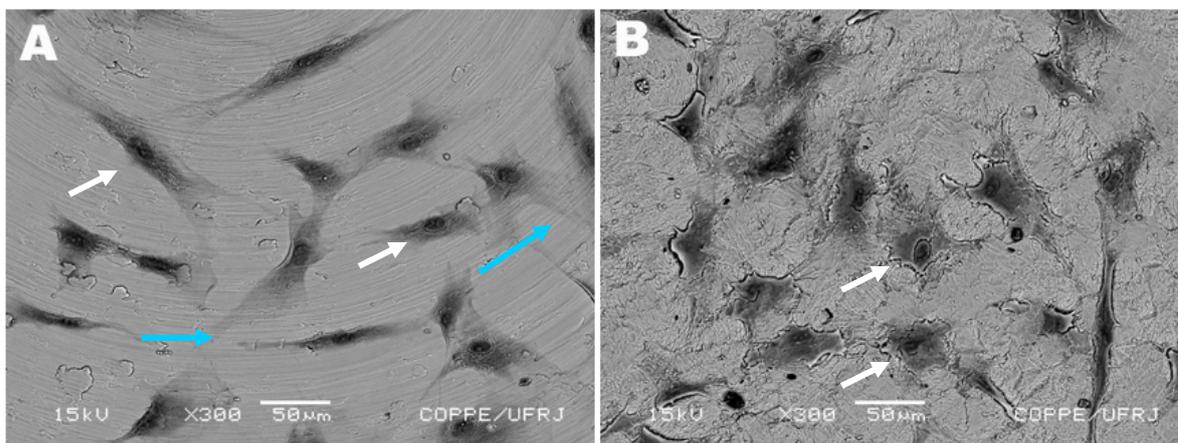


Figura 23 – Figura demonstrativa das células estromais aderidas às distintas superfícies (análise de retroespalhamento ao microscópio eletrônico de varredura)

A – Células aderidas em superfície Mq (MEV – 300 vezes). Observar aspecto espraioado (setas brancas) das células e ordenação ao longo dos sulcos (setas azuis) obtidos pelo processo de usinagem.

B – Células aderidas em superfície ST (MEV – 300 vezes). O aspecto estrelado (setas) e com menor espraioamento foi marcante nesta superfície.

6.3.1 Contagem de células

Os resultados apresentados para a avaliação da contagem de células aderidas sobre espécimes foram obtidos nos discos de titânio Mq e ST (figuras 23 e 25) após 18 horas.

As médias, desvios padrão e erros padrão da contagem de células aderidas sobre as superfícies testadas são apresentados na tabela 9.

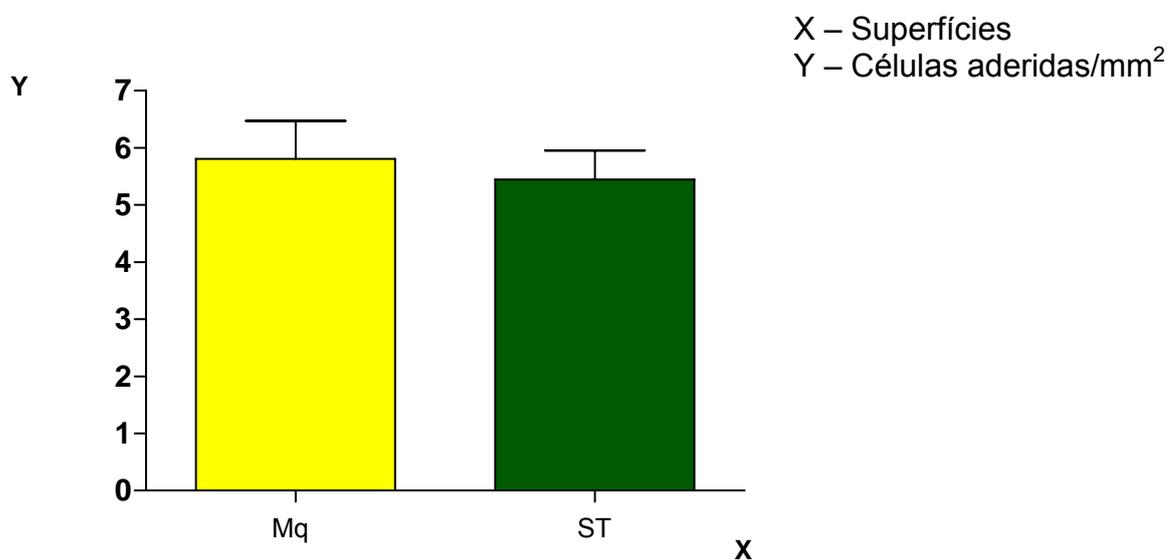
Embora as morfologias das células tenham apresentado divergências, as mesmas foram capazes de aderir em ambas as superfícies. E o teste de Mann Whitney aplicado à tabela 9 (Apêndice A), observado na figura 24 mostrou não haver significância ($p > 0.05$) em relação ao número de células aderidas sobre os discos (tabela 10).

Tabela 9 – Média, desvio padrão e erro padrão da contagem de células aderidas.

| | Lisos | Rugosos |
|----------------------|--------|---------|
| Média | 5,852 | 5,370 |
| Desvio Padrão | 4,391 | 2,857 |
| Erro Padrão | 0,8451 | 0,5499 |

Tabela 10 – Teste de Mann Whitney aplicado aos valores da tabela 9 – Adesão (Mq X ST) após 18 horas.

| | |
|---------------------------|-------------------|
| Valor de p | 0,9241 |
| Valor de p sumário | Não significativa |

**Figura 24** – Gráfico das médias da contagem total de células e desvios padrões em discos Mq e ST após 18 horas.

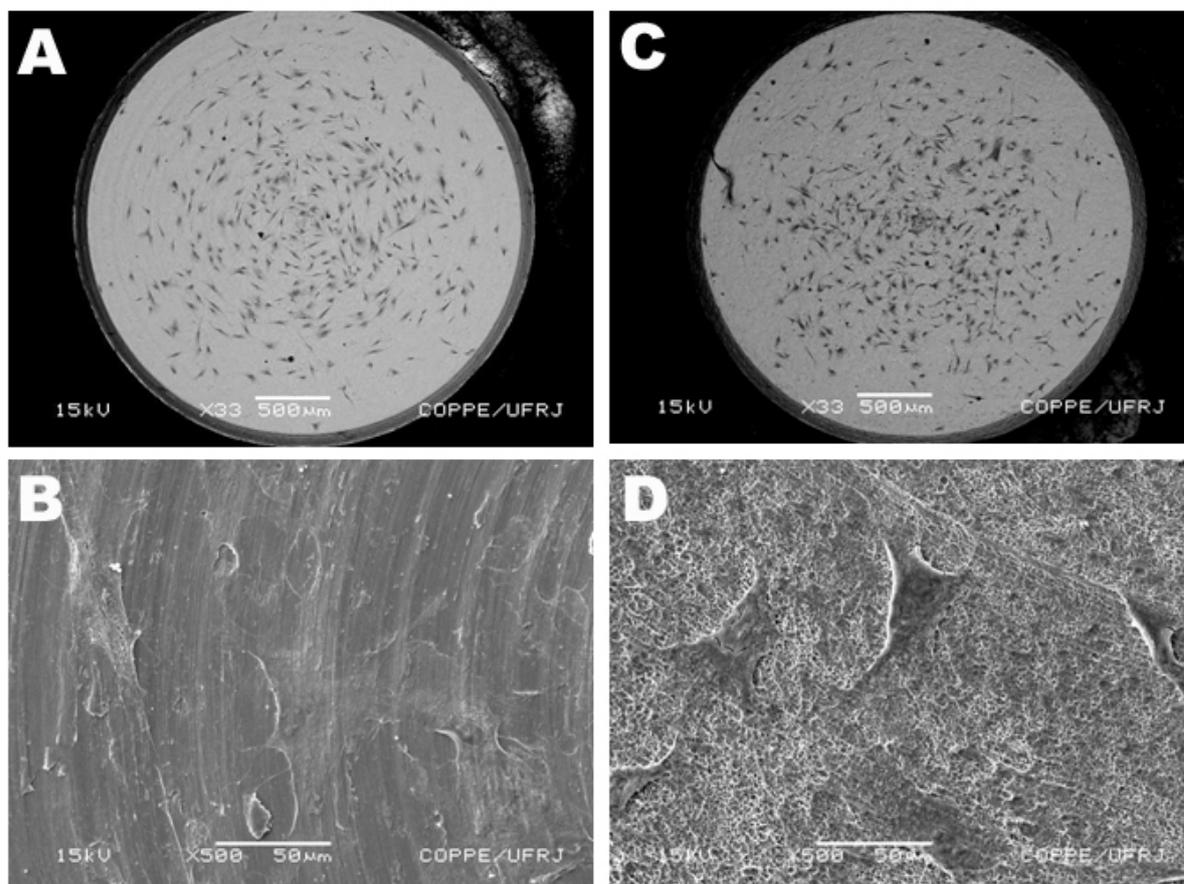


Figura 25 – Figura demonstrativa das células estromais aderidas sobre as superfícies (MEV)

A – Análise de retroespalhamento (adesão) em superfície Mq (MEV – 33X).

B – Microscopia das células aderidas em superfície Mq (MEV – 500X)

C – Análise de retroespalhamento (adesão) em superfície ST (MEV – 33X)

D – Microscopia das células em superfície ST (MEV – 500X)

A análise qualitativa das células aderidas na análise de retroespalhamento (A/C) mostrou não haver diferenças significantes em relação a adesão sobre as superfícies avaliadas após 18 horas. Entretanto a morfologia celular apresentou diferenças marcantes. Enquanto nas superfícies Mq (figura 25 B) as células mostravam-se espaiadas, sobre as ST (figura 25 D) o comportamento celular mostrou-se completamente diferente com menor espaiamento, como já citado, e aspecto estrelado.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

O principal objetivo de nosso estudo foi avaliar a adesão de células estromais obtidas da medula óssea humana de doadores sadios sobre dois tipos de superfícies de implantes osteointegráveis utilizados em odontologia (maquinadas e tratadas) após avaliação das características físico-química de ambas.

Compreender o comportamento da célula frente ao biomaterial é altamente relevante para a compreensão do fenômeno de osseointegração (ANSELME, 2000), onde a diferenciação celular, formação de matriz osteóide e subsequente mineralização desta são necessárias na formação da interface (SCHNEIDER, et al. 2003).

A osseointegração definida originalmente consistia em “uma conexão direta, estrutural e funcional, entre osso vivo ordenado e a superfície do implante sob carga funcional” (BRÅNEMARK. et al., 2001). Todavia, em 1987 Albrektsson e Jacobsson realizaram uma revisão dos parâmetros que pudessem determinar as reações teciduais em torno de implantes de titânio. Estes autores observaram que apesar do termo osseointegração ter se tornado popular rapidamente, uma interposição de tecido fibroso em cerca de 90% da interface condizia com uma “fibro-integração”, ou no máximo, uma “fibro-ósseo-integração”. Sugeriu-se então, que a razão para tal definição talvez tivesse ganhado popularidade devido ao fato de que interfaces fibro-integradas pudessem conotar insucessos, ou talvez um erro de interpretação do fenômeno. Fato é que surgiu então uma nova definição, onde osseointegração passa a ser definida como o contato direto entre a superfície do implante sob carregamento e osso, sob observação do microscópio óptico.

Ainda nesta revisão, os autores citaram a importância do controle das propriedades das superfícies para que ocorra a “aceitação” da fixação pelos tecidos vivos. Observou-se que a baixa energia de superfície de alguns implantes, como os

originalmente lisos propostos por Brånemark, proporcionariam o que denominaram de “parede vazia”, ou seja, pobre celularidade, baixa adesão e uma interface fibrosa separada por um fino filme condicionado por uma rica zona de lipídios. Por outro lado, observações ao microscópio eletrônico de varredura demonstravam que implantes com altas energias superficiais permitiam a adsorção de proteínas distintas, as quais formavam uma resistente ancoragem. Mais a frente levantaram ainda a questão de que o contato osso-implante em superfícies rugosas seria maior que em lisas, o que proporcionaria uma maior estabilidade da fixação, concluindo ainda que além dos benefícios de uma superfície ideal o sucesso das fixações dependeria ainda, e muito, de uma técnica cirúrgica apurada.

Passados os anos do pioneirismo e das descobertas, entramos em uma fase científica que podemos chamar de fase da terapia implantológica. Onde a osseointegração passa a ser conceituada como a observação clínica do fenômeno, visto que o contato total do osso ao implante ainda não é observado (ALBREKTSSON, WENNERBERG, 2005). Nesta fase o entendimento biológico de como ocorre a formação da interface ainda mantém diversas perguntas sem respostas. Onde o estudo das superfícies e seu comportamento no vivo tentam elucidar as mais frequentes dúvidas.

Entretanto o que se observa nestes anos pós osseointegração é a disseminação entre os clínicos de diversas técnicas que visam melhorar apenas o desempenho estético (imediate) dos implantes osteointegráveis; fato observado constantemente em salas de congressos e encontros clínicos da implantodontia.

ALBREKTSSON; WENNERBERG (2005) clamam por estudos voltados para o desempenho longitudinal das fixações dentárias. E observam que grande parte dos implantes osteointegráveis comercializados atualmente são cópias de sistemas consagrados desenvolvidas sem maiores cuidados.

Torna-se iminente que o clínico consciente tenha total domínio de sua área de atuação. E principalmente do sistema ao qual se propõe a trabalhar. Caso contrário este deverá ser considerado um “operador” ao invés de um profissional da implantodontia. Onde as diferenças entre ambos nos parecem bem claras.

Estudos que almejem o conhecimento dos diversos componentes dos sistemas de implantes fazem-se *mister*, onde as superfícies em contato com o osso tornam-se sensivelmente especiais pelo fato de serem as responsáveis pelo início do fenômeno da osseointegração.

ALBREKTSSON; WENNERBERG (2004 [a]), dividem a qualidade das superfícies em três categorias: (1) propriedades mecânicas, (2) topográficas e (3) físico-químicas. Sendo a primeira relacionada a capacidade da superfície resistir as tensões; a segunda relacionada ao grau de rugosidade, foco de estudo nas últimas décadas. E a terceira relacionada a fatores como energia superficial e química de superfície (contaminantes, íons, etc.).

Atuais dados da literatura como otimização da mineralização, sejam eles devido a própria rugosidade e resposta celular (BOYAN et al., 2003), aos aspectos relacionados a molhabilidade (BUSER et al., 2004; RUPP et al., 2006) ou ao contato osso-implante e resistência ao torque de remoção (THOMAS; COOK, 1985; CARLSSON et al., 1988; WENNERBERG et al., 1995; WENNERBERG, 1996; CORDIOLI et al., 2000) realmente parecem mostrar a importância da rugosidade das superfícies para manutenção de uma interface estável. Todavia, o grau de rugosidade ideal, como já comentado anteriormente, ainda não foi mensurado (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004 [a]).

Estudos sobre topografia são e continuarão sendo altamente relevantes. E índices como a rugosidade média tem sido de grande valia no entendimento da interface osso-implante (WENNERBERG, 1996).

O R_a é uma medida universalmente aceita e a mais usada internacionalmente como parâmetro de rugosidade de superfícies (NAMEN, 2003 [b]).

THOMAS; COOK (1985); GOTFREDSEN et al (1992) traçam um perfil do que seria uma superfície lisa ou rugosa. THOMAS; COOK (1985) em um estudo comparativo onde foi testado o torque de remoção utilizando vários tipos de materiais de implante em cães, notaram que implantes com R_a de $2,16\mu\text{m}$ (os quais qualificaram como os mais rugosos) promoviam uma maior resistência na interface óssea, ao contrário daqueles com R_a $0,13\mu\text{m}$, que então qualificaram como muito lisos.

GOTFREDSEN et al (1992), em uma avaliação sobre o comportamento biológico *in vivo* entre superfícies “ditas” lisas e superfícies tratadas, procuraram caracterizar as superfícies ao MEV e à perfilometria bidimensional utilizando vários parâmetros de quantificação, entre estes a rugosidade média. Estes autores não encontraram diferenças significantes ao R_a de ambas, com valores de $1,0$ e $1,1\mu\text{m}$. Entretanto, apesar de uma rugosidade média tão próxima, o torque de remoção da superfície tratada mostrou-se significantemente maior. Todavia a análise qualitativa

da histologia ao final dos experimentos não mostrou significância para as amostras testadas, indo de encontro aos resultados da presente dissertativa.

De acordo com os autores citados acima, podemos então traçar uma qualificação para as amostras do presente estudo através da análise quantitativa da perfilometria. A rugosidade média obtida nas superfícies de 0,12 para as lisas e 0,32 para as rugosas classificam-nas respectivamente como muito lisas a lisas.

A análise qualitativa ao microscópio eletrônico de varredura das amostras testadas mostrou algumas diferenças em relação a superfície do implante como um todo. Podemos notar que, ao primeiro instante não há um padrão topográfico entre o corpo do implante e o ápice. Foi observado que a região apical da fixação (figura 16 D) apresenta irregularidades em forma de “lascas” em relação as roscas, onde estas não são notadas, assim como nos discos (figuras 20 D/E/F). Tal característica nos levaria a imaginar que o comportamento celular poderia se manifestar de forma diferente nestes sítios devido à distinta topografia (LARSSON et al, 1997; SCHWARTZ et al., 1999 ; LUMBIKANONDA; SAMMONS, 2001; ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004[a]). Segundo LUMBIKANONDA; SAMMONS (2001), estes fatores são altamente relevantes para a diferenciação osteoblástica. Entretanto estes autores parecem extrapolar quando tentam invalidar os experimentos com discos de titânio, e citam que estes desprezam condições reais, como processo de fabricação e empacotamento. Em nossos estudos, os discos foram recebidos na mesma forma comercial e embalagem dos componentes fabricados pela empresa (esterilizados). Soma-se ainda que, estudos mais recentes (SADER et al, 2005), demonstraram que independente da morfologia das células em diferentes rugosidades nas primeiras horas; quando estas são avaliadas em culturas de longa duração (*osteoblast like cells*), os fenômenos de adesão, proliferação e diferenciação terão pouca significância em relação à síntese de matriz protéica depositada.

Se nos basearmos nos estudos de TAVARES et al (2007) (figura 11 A/B) e SADER et al (2005) (figura 11 C), poderemos observar que a topografia dos espécimes mostraram características de superfícies que não sofreram jateamento. Segundo estudos de ORSINI et al. (2000) e SADER et al. (2005), superfícies jateadas apresentam macro-rugosidades na forma de “vales” (figura 11 C), enquanto as atacadas por ácidos, “micro-picos”, como as avaliadas em nossos estudos (figura 11B).

Em relação ao implante (figura 16 D), os discos ST (figuras 20 D/E/F) mostraram maior uniformidade quando avaliados ao MEV, fato compreensível devido a menor complexidade estrutural.

A sondagem por espectroscopia de energia dispersiva (figuras 17/18/19) surpreendeu devido ao baixo nível de contaminantes a alta concentração de titânio das amostras apresentadas. O que pode ser explicado pelo processo de esterilização e empacotamento dos mesmos. Além do tipo de tratamento da superfície, que possivelmente dificulte a presença, ou inclusão de substâncias exógenas.

A análise qualitativa da topografia dos discos de titânio Mq demonstrou desgastes característicos do processo de usinagem (figuras 20 A/B/C, setas brancas), além de irregularidades com aspecto de cavacos (figura 20 A, seta azul), que dificultaram caracterizá-los como totalmente lisos.

COOPER (2000) considera errônea a categorização das superfícies em lisas e rugosas. E observa que estas deveriam ser definidas por seus processos de fabricação, como por exemplo, superfícies usinadas/maquinadas, jateadas por determinado material, atacadas por determinado ácido, etc.

A medição dos ângulos de contato possibilitou inferir uma maior energia de superfície aos espécimes ST, como demonstrado na figura 22. Este tipo de análise, embora não invalide a aferição desta energia (NAMEN et al. 2003 [b]), nos pareceu mais adequada devido ao exposto por KASEMO; LAUSMAA (1994) em relação as constantes modificações ocasionadas pelo meio ambiente sobre as camadas de elétrons. Estes fatores podem ser observados nos estudos de ZHAO et al. (2005) e ORSINI et al. (2000). Enquanto ZHAO et al (2005) inferem a espessura da camada de óxido à energia superficial livre do titânio. ORSINI et al (2000) notaram diferentes gradientes de TiO_2 em diferentes áreas de uma mesma superfície avaliada; o que demonstra o proposto anteriormente. Também em nossos estudos foram notados diferentes ângulos de contato em superfícies similares, reiterando o proposto pelos autores citados.

Frequentemente, como já citado anteriormente, observa-se que tem sido demonstrada a possibilidade de que altas energias de superfície do titânio possam causar efeitos estimulantes na diferenciação dos osteoblastos *in vitro* bem tais como aumento da fosfatase alcalina e atividade da osteocalcina, contribuindo para a formação óssea (LUMBIKANONDA; SAMMONS, 2001; LIM; DONAHUE, 2004;

SAMMONS et al, 2005; ZHAO et al., 2005). Uma análise “macroscópica” deste comportamento pode ser obtida ao microscópio eletrônico de varredura em relação às células estromais (figuras 25 B/D) onde observamos distintas morfologias celulares em superfícies Mq e ST. O estudo destas imagens demonstram o quanto a molhabilidade pode ser importante no entendimento de como as células se comportarão frente ao biomaterial (BUSER et al. 2004; RUPP et al, 2006; KENNEDY et al, 2006). A análise ao microscópio eletrônico de varredura mostra o aspecto estrelado das células aderidas sobre a superfície ST (figura 25 D), enquanto sobre as superfícies Mq estas apresentam-se espreiadas (figura 25 B).

De acordo com o que foi exposto no último parágrafo, os valores das medidas dos ângulos de contato são extremamente importantes e estão diretamente envolvidos nos efeitos de molhabilidade e adesão. Uma molhabilidade homogênea, é aquela em que o líquido penetra nas ranhuras da superfícies completamente, e na heterogênea, ao contrário, o ar impede a entrada do líquido nestas ranhuras. Nesta linha de raciocínio, podemos imaginar a importância do soro ou do sangue “molhando” a superfície de titânio interferindo sobre todo processo biológico que virá posteriormente.

Considerando ainda nossos resultados, como visto na tabela 8 na análise de multiplas comparações; quando observamos o titânio ST através da medição do ângulo de contato com a água deionizada e o glicerol observamos que não há diferença significativa entre eles, o mesmo acontecendo com os Mq. Podemos inferir, neste caso, que a interação da superfície ST do titânio com os líquidos testados não interfere tanto no ângulo de contato. Os eventos que ocorrerão em relação as moléculas destes líquidos com a superfície desse sólido, que é altamente reativo, não depende somente desta medida. Segundo RUPP et al. (2006) a energia de superfície, pH, temperatura e a contaminação de moléculas do ar também interferem no resultado das medições (apesar do controle e antissepsia no laboratório). Soma-se ainda a presença de substâncias outras, como os hidrocarbonetos do ar que influenciam nos valores dos ângulos de contato.

Ainda em seus estudos, os autores relatam que, inicialmente após o tratamento do titânio este passa a ter uma tendência a hidrofobicidade devido à apreensão de moléculas de oxigênio no interior dos poros obtidos. A medida em que estas moléculas vão sendo desprendidas a superfícies passam a uma característica hidrofílica. Entretanto numa fase posterior, a contaminação pelos hidrocarbonetos do

ar que ordenam-se sobre o titânio, como citado anteriormente, fazem com que este retome características hidrofóbicas. Continuando, os autores ainda comentam que a contaminação atmosférica, por substâncias outras, inerentes a este ambiente, induzem a manutenção da hidrofobicidade. Sendo esta uma das razões para que se explique a diminuição da hidrofilia dos implantes de titânio. Estes autores também observam que, novos tratamentos superficiais que tenham a capacidade de aumentar o contato água/biomaterial, tendem a diminuir o aprisionamento de ar nos poros. Desta maneira a hidrofiliidade inicial é aumentada nas ligas de titânio e tendem a promover uma “aceleração” nas reações da interface biomaterial/bio-sistema *in vivo*.

Em nossos estudos, como não poderia deixar de ser, os resultados dos ângulos também sofreram influência do oxigênio do ar, e da contaminação atmosférica. Uma vez que os espécimes não foram embalados a vácuo e nem manipulados em atmosfera inerte . Isto mostra a complexidade das interferências que envolvem as medições de ângulo de contato. Conclui-se então que, os transtornos gerados pela a hidrofobicidade, induzida pelas contaminações do material, são as principais razões para a redução da hidrofiliidade das superfícies de titânio.

Em relação as superfícies por nós estudadas, segundo os parâmetros de GROESSNER-SCHREIBER et al. (2006), ambas apresentaram caráter hidrofílico (ângulo de contato menor que 90 graus). Apesar de haver diferenças significantes ($p < 0,001$) em relação às hidrofilias apresentadas por Mq e ST. O autor ainda comenta que com o aumento do R_a (rugosidade média) de 0,03 para 0,52 μm em uma superfície de implante, uma significativa diminuição do ângulo de contato pode ocorrer, passando de 109° para 36 graus, tornando-se esta mais hidrofílica; como observamos em nosso estudo.

A média dos valores de rugosidade, na presente pesquisa , variaram entre 0,12 para a superfície Mq e 0,31 μm para a superfície ST. Nossos dados, corroboram com o autor acima citado. Embora em nossa pesquisa a variação da medição dos ângulos de contato tenham sido entre 53,76 graus $\pm 4,166$. Apresentando-se bem menores que os parâmetros traçados por GROESSNER-SCHREIBER et al. (2006). Para as amostras Mq , variou de 76,16 $\pm 13,49$, quando utilizou a água como líquido medidor.

Por conseguinte, como podemos observar, o tipo de tratamento que a superfície vier a sofrer será responsável pelo grau de molhabilidade desta. Entretanto tratamentos “agressivos” como aqueles realizados por processos de decapagem (WAGNER et al., 2003) entre outros, tendem a promover uma hidrofobicidade do titânio, além de uma maior liberação de íons e dificuldade de adesão celular (WENNERBERG, 1996; COOPER, 2000). Sugerindo que qualquer tentativa de otimização de uma superfície de implante deva tentar promover uma rugosidade moderada, conforme o proposto pela literatura até o atual momento (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004 [a]).

Finalmente o procedimento de cultura celular vem observar o microambiente do processo de osseointegração; que depende, em parte da adesão e espraiamento dos osteoblastos sobre o a superfície do material (BOWERS et al, 1992).

Muitos estudos tem focado o comportamento *in vitro* de células com características osteoblásticas (*osteoblast like cells*) oriundas de animais e osteossarcoma (SCHWARTZ et al., 1999), entretanto a possibilidade da utilização de uma população comum ao sítio *in vivo* nos parece altamente viável, pois seria o mais próximo do real que o estudo *in vitro* poderia chegar.

Se nos basearmos em fisiologia óssea veremos que as células multipotentes geradoras de miofibroblastos e osteoblastos têm a mesma origem embrionária (SCHWARTZ et al., 1999), e que sinalizadores irão desencadear o processo que dará origem a um ou a outro (BOYAN et al., 2003), ou até mesmo um mioblasto, adipócito ou um condrócito (figura 8). Sendo assim a população estromal poderia testar o biomaterial inferindo a este o seu verdadeiro potencial, seja ele osteogênico, osteocondutor, osteoindutor ou osteopromotor, através ativação das células osteoprogenitoras.

Durante a instalação da fixação esta deverá obter uma estabilidade mecânica inicial afim de que os eventos da formação da interface venham a ocorrer, assim como acontece em fraturas ósseas (McKIBBIN, 1978). Após ultrapassar a barreira do osso cortical e entrar em contato com o osso medular a superfície estará imersa no estroma ósseo. Neste microambiente, sistemas independentes irão interagir com o biomaterial. São eles o sistema hematopoiético e o estroma de suporte ósseo propriamente dito (BIANCO et al., 2001). O sistema hematopoiético dará origem as células sanguíneas diferenciadas, geradas a partir de uma pequena população de células-tronco de capacidade ilimitada. Também serão encontradas células

estromais, que originarão as células reticulares mielossuportivas, osteoblastos, condrócitos, adipócitos e células musculares lisas. A utilização de células estromais faz-se interessante devido a sua fácil adesão quando plaqueadas em baixa densidade. Em condições apropriadas estas células formam colônias de células fibroblastóides, sendo cada colônia derivada de um único clone precursor ou CFU-F (*Colony - Forming Unit – Fibroblast* ou Unidades Formadoras de colônia com aspecto fibroblastóide). Esta colônia apresenta células com características fibroblastóides categorizadas como células tronco ou progenitoras mesenquimais da medula óssea (BIANCO et al., 2001; BALDUÍNO 2006).

Após a décima oitava hora a análise quantitativa demonstrou não haver significância ($p > 0.05$) quanto ao número de células aderidas sobre as distintas superfícies (tabela 10). O que também pode ser observado na figura 24. Estes dados contrariam o exposto por SAMMONS et al. (2005). Estes autores afirmam que superfícies com altos potenciais de molhabilidade seriam responsáveis não somente pela maior produção de matriz colágena como também pelo aumento de células aderidas.

Ao microscópio eletrônico de varredura, como já observado, podemos notar uma morfologia diferenciada frente as duas superfícies testadas. Os tipos celulares estudados apresentaram o mesmo comportamento encontrado em estudos pregressos com *osteoblast like cells* (ORSINI et al., 2000; SADER et al., 2005).

A análise qualitativa de retroespalhamento (figuras 25 A/B) mostrou células com aspecto poligonal estrelado sobre as superfícies ST, sendo que sobre as superfícies Mq estas células sofreram amplo espraiamento e tenderam a ordenarem-se no sentido dos sulcos (figura 25 A) gerados pelo processo de usinagem (SAMMONS et al., 2005). Sugere-se que áreas com características rugosas ou de sulcos devam interagir com o citoesqueleto facilitando a adesão (ORSINI et al., 2000). Nossos dados mostraram que um diferente padrão de adesão celular ocorreu sobre as superfícies ST. O que leva a crêr que, sendo estas superfícies suficientemente capazes de promoverem distintas atividades das células estromais, podem então, ter a capacidade de induzir a produção de proteínas diferenciadas por estas células.

Com o exposto, mostra-se pertinente a observação de que a energia superficial não parece ser fator decisivo em relação ao fenômeno de adesão contrariando o proposto por BOYAN et al (2003), ALBREKTSSON; WENNERBERG

(2004 [a]) e GROESSNER-SCHREIBER et al. (2006). Porém é importante observar que não avaliamos a qualidade da adesão, sugerindo que estudos futuros possam responder melhor esta questão. Entretanto, a morfologia das células parece mostrar que esta energia (inferida pelos ângulos de contato), assim como a topografia podem ser responsáveis pelas modificações do citoesqueleto. Dados a serem comprovados com estudos direcionados.

O estudo apresentado vem de encontro ao clamado por ALBREKTSSON; WENNERBERG (2005), onde procurou-se analisar as características das superfícies de implantes sob os aspectos físico-químicos e biológicos. Porém, o método proposto não substitui a avaliação *in vivo*, devido a ausência de fatores outros que possam desencadear formas adversas da expressão celular como inflamações, infecções, etc.

A pesquisa *in vitro* tem a possibilidade de um controle ideal do microambiente. O que apesar de não invalidar os resultados apresentados, pode omitir outros.

As limitações da avaliação da adesão deste estudo dificultou uma análise longitudinal em relação a proliferação e diferenciação. Entretanto, SADER et al. (2005) em um estudo de adesão, proliferação e diferenciação com *osteoblast like cells*, demonstrou que após 21 dias, o fenótipo osteoblástico já apresenta-se estabelecido, assim como a sua interação com o substrato. Após este período foi observado que as superfícies rugosas apresentavam células em síntese de proteínas, e as lisas células espreiadas, que pareciam manter-se mais como barreiras entre o tecido e o metal do que como promotoras de integração; sugerindo que estas superfícies não seriam favoráveis a uma integração mecânica. ORSINI et al (2000) observaram e comentaram os dados anteriores, onde as superfícies rugosas teriam a possibilidade de criar um ambiente osteogênico devido ao aumento do contato osso-implante e expressão da matriz osteóide. Entretanto as superfícies por nós estudadas mostraram a possibilidade de alterar a morfologia das células estromais ao terem modificadas as suas topografias apesar de ambas serem consideradas lisas. O que nos leva a concluir o já sugerido anteriormente (SAMMONS et al. 2005); onde a necessidade da busca de uma superfície que possa ser considerada ideal para o tecido ósseo deva ser uma constante.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos na presente pesquisa podemos concluir que as superfícies analisadas mostraram diferentes padrões qualitativos e quantitativos.

Ambas as superfícies apresentaram significantes diferenças topográficas. Enquanto as superfícies Mq apresentaram ranhuras e cavacos provenientes do processo de usinagem, as superfícies ST mostraram características de terem sido tratadas por ácidos (MEV). Entretanto quando analisadas ao perfilômetro, Mq e ST apresentaram-se como lisas.

Em relação ao número de contaminantes ambas apresentaram traços não significantes destes quando avaliadas ao EDS. Por outro lado, Mq e ST continham uma alta concentração de titânio. Estes dados, assim como a molhabilidade das superfícies demonstram que ambas apresentam características de superfícies hidrofílicas. Embora as superfícies ST tenham apresentado ângulos de contato menores.

Em relação ao comportamento biológico as células apresentaram diferentes morfologias quando aderidas às distintas superfícies (MEV). Estes dados sugerem que as características físico-químicas possam influenciar no comportamento destas. Entretanto estas mesmas características não parecem interferir na análise quantitativa do fenômeno de adesão após a décima oitava hora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAMSSON ,I. et al. Bone and soft Tissue Integration to Titanium Implants with Different Surface Topography: An experimental Study en the Dog. **I J Oral Maxillofac Implants**, v.16, p.323-332, 2001.
2. ABRAHAMSSON ,I. et al. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. **Clin Oral Impl Res**, v.15, p.381-392, 2004.
3. ADELL,R. et al. A 15 year study of osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. **Int J Oral Surg**, v.10, p.387-416, 1981.
4. ADELL,R. et al. Marginal Tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures.(I) A 3-year longitudinal prospective study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.15, p.39-52, 1986.
5. ALBERTS,B. et al. Células Diferenciadas e a Manutenção dos Tecidos. In Alberts,B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 3^a ed.Porto Alegre, Editora Artes Médicas do Sul LTDA, Cap.22, p.1139-1193 , 1997.
6. ALBREKTSSON,T. et al, The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.1, p.11-25, 1986.
7. ALBREKTSSON,T.; JACOBSSON,M. Bone-metal interface in osseointegration. **J Prosthet Dent** v.57, n.5 597-607, 1987.

8. ALBREKTSSON,T.; WENNERBERG,A. Oral Implant Surfaces: Part 1-Review Focusing on Topographic and Chemical Properties of Different Surfaces and In Vivo Responses to them. **Int J Prosthodont**, v.17, p.536-543, 2004[a].
9. ALBREKTSSON,T.; WENNERBERG,A. Oral Implant Surfaces:Part 2-review Focusing on Clinical Knowledge of Different Surfaces. . **Int J Prosthodont**, v.17, p.544-564, 2004[b].
10. ALBREKTSSON,T.; WENNERBERG,A. The impact of Oral Implants – Past and Future, 1966 – 2042. **J Can Dent Assoc**, v.71, n.5, p.327-327-d, 2005.
11. ANDERSEN,E.; HAANAES,H.R.; KNUTSEN,B.M. Immediate loading of single-tooth ITI implants in the anterior maxilla: a prospective 5-year pilot study. **Clin Oral Impl Res**, v.13, p.281-287, 2003.
12. ANSELME,K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v.21, p.667-681,2000.
13. BAHAT,O. Branemark System Implants in the Posterior Maxilla: Clinical Study of 660 Implants Followed for 5 to 12 years. **In J Oral Maxillofac Implants**, v.15, p.646-653, 2000.
14. BAIER,R.E.; MEYER,A.E. Surface preparation. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.3. p.9-20, 1988.
15. BARNETT,S.C. et al. Identification of human olfactory ensheathing cell that can effect transplant-mediated remyelination of demyelinated CNS axons. **Brain**, v.123, p.1581-1588, 2000.
16. BALDUÍNO, Alex. **Análise Celular e Molecular do Componente Estromal da Região Subendosteal da Medula Óssea: O Nicho das Células Tronco Hematopoiéticas**. Rio de Janeiro, RJ, 2006. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.
17. BECK Jr, G.R.; ZELER,B; MORAN,E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. **PNAS**, v.97, n.15, p.8352-8357, 2000.

18. BENINGTON, I.C. et al. Thermal changes observed in implant sites during internal and external irrigation. **Clin Oral Impl Res**. v.13, p.293-297, 2002.
19. BERNARD, J-P et al. The anchorage of Branemark and ITI implants of different lengths. I. An experimental study in the canine mandible. **Clin Oral Impl Res**, v.14, p.593-600, 2003.
20. BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Marrow stromal stem cells. **JCI**, v.105, n.12, p.1663-1669, 2000.
21. BIANCO, P. et al. Bone Marrow Stromal Stem Cells : Nature, Biology, and Potential Applications. **Stem Cells**, v.19, p.180-192, 2001.
22. BINON, P.P. Implants and Components Entering the New Millenium. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.15, p.76-94, 2000.
23. BISCHOF, M et al. Implant stability measurement of delayed loaded implants during healing. A clinical resonance-frequency analysis study with sandblasted-and-etched ITI implants. **Clin Oral Impl Res**, v.15, p.529-539, 2004.
24. BLAIR, H.C.; ZAIDI, M. e SCHLESINGER, P.H. Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. **Biochem J**, v.364, p.329-341, 2002.
25. BOSKEY, A.L.; PASCHALIS, E. Matrix Proteins and Biomineralization In **Bone Engineering**, Based on the proceedings of the bone engineering workshop held in Toronto, Ontário, December 2-3, 1999. Hong Kong, Rainbow Graphic and Printing LTD. Chapter 5, p.44-62, 2005.
26. BOTTICELLI, D. Bone regeneration at implants with turned or rough surfaces in self-cotained defects. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**, v.32, p.448-455, 2005.
27. BOWERS, K.T. et al. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblasts response in vitro. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.7, p.302-310, 1992.
28. BOYAN, B.D. et al. Osteoblasts Generate an Osteogenic Microenviroment when Grown on Surfaces with Rough Microtopografies. **European Cells and Materials**, v.5, n.2, p.11-12, 2003.

29. BRANEMARK,R. et al. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: A Review. **Journal of Rehabilitation Research and Development**, v.38, n.2, p.175-181, 2001.
30. BRUNSKI,J.B. *In vivo* Bone Response to Biomechanical Loading at the Bone/Dental-Implant Interface. **Adv Dent Res**, v.13, p.99-119, 1999.
31. BRUNSKI,J.B.; PULEO,D.A.; NANJI,A. Biomaterials and Biomechanics of Oral and Maxillofacial Implants: Current Status and Future Developments. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.15, p.15-46, 2000.
32. BRUNSKI,J.B. et al. Transfer of Mechanical Load across the Interface. In BRANEMARK,P-I **The Osseointegration Book: From Calvarium to Calcaneus**. Berlim, Quintessenz Verlags-GMBH, Chapter 10, p.209-249, 2005.
33. BUCHMAN,S.R. **A historical perspective of Wolff's Law**. AO TRUSTEES MEETING, Creete, Greece, June 2003. Disponível em: http://www.aofoundation.org/portal/AOFileServer/PortalFiles?FilePath=/Extranet/Active/att/wor/act/Dialogue/2003_2/Wolffs_Law.pdf> Acesso em: 10/03/2007.
34. BUDD,T.W. et al. Microscopic Observations of the Bone/Implant Interface os Surface-Treated Titanium Implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**. V.6, p. 253-258, 1991.
35. BUDD,T.W. et al. Visualization and Initial Characterization of Titanium Boundary of the Bone-Implant Interface of Osseointegrated Implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.7, p.151-160, 1992.
36. BURG,K.J.L.; PORTER,S.; KELLAM,J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.21, p.2347-2359, 2000.
37. BUSER,D. et al. Enhanced Bone Apposition to a Chemically Modified SLA Titanium Surface. **J Dent Res**, v.83, n.7, p.529-533, 2004.
38. CALLISTER,W.D. Imperfeições em Sólidos capítulo 4 :45-62 **In Ciência e Engenharia de materiais- Uma Introdução** Copyright LTC Rio de Janeiro- R.J, 2000.

39. CARLSSON,L. et al. Removal Torques for Polished and Rough Titanium Implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.3, p.21-24, 1988.
40. CHAMBERS,T.J.; DARBY,J.A.; FULLER,K. Mammalian collagenase predisposes bone surfaces to osteoclastic resorption. **Cell Tissue Res**, v.241, p. 671-675, 1985.
41. CHEN,J.-L. et al. Osteoblast Precursor Cells are Found in CD34⁺ Cells from Human Bone Marrow. **Stem Cells**, v.15, p.368-377, 1997.
42. CHENG SU-LI et al. Differentiation of Human Bone Marrow Osteogenic Stromal Cells *in Vitro* : Induction of the Osteoblast Phenotype by Dexamethasone*. **Endocrinology**, v.134, n.1, p.277-286 , 1994.
43. CHIAPASCO,M. et al. Perspectivas Futuras, In CHIPASCO,M.; ROMEO,E. **Reabilitação Oral com Prótese Implantossuportada para Casos Complexos**. São Paulo. Livraria Editora Santos, Capítulo 13, p.467-488, 2007.
44. CHIAPASCO,M.; ROSSI,A. Cirurgia pré-implante nas atrofia dos maxilares, In CHIPASCO,M.; ROMEO,E. **Reabilitação Oral com Prótese Implantossuportada para Casos Complexos**. São Paulo. Livraria Editora Santos, Capítulo 3, p.131-162, 2007.
45. COCHRAN,D.L. et al. The use of reduced healing times on ITI® implants with sandblasted and acid-etched (SLA) surface: Early results from clinical trials on ITI® SLA implants. **Clin Oral Impl Res**, v.13, p.144-153, 2002.
46. CONNOLLY,J. et al. Development of an Osteogenic Bone-Marrow Preparation. **J Bone Joint Surg Am**, v.71, p.684-691, 1989.
47. COOPER,L.F. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. **J Prosthet Dent**, v.84, p.522-534, 2000.
48. CORDIOLI,G. et al. Removal Torque and Histomorphometric Investigation of 4 Different Titanium Surfaces: An Experimental Study in the Rabbit Tibia. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.15, p.668-674, 2000.

49. DAGA,A. et al. Enhanced engraftment of EPO-transduced human bone marrow stromal cells transplanted in a 3D matrix in non-conditioned NOD/SCID mice. **Gene Therapy**,v.9, p.915-921, 2002.
50. D'ÁLONZO,R.C. et al., Regulation of Collagenase-3 and Osteocalcin Gene Expression by Collagen and Osteopontin in Differentiating MC3T3-E1 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.27, p.24788-24798, 2002.
51. DAO,T.T., ANDERSON,J.D., ZARB G.A. Is osteoporosis a risk factor for osseointegration of dental implants? **Int J Oral Maxillofac Implants**,v.8, p.137-144, 1993.
52. DUCY,P et al. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. **Genes & Dev**, v.13, p.1025-1036, 1999.
53. DUMPLOMB,L. et al. Embryonic stem cells: new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation. **Stem Cells**. Primeira Publicação online, 09/11/2006. Disponível em: <http://stemcells.alphamedpress.org/cgi/reprint/2006-0395v1.pdf>
Acesso em 02/06/2007 às 21:30h.
54. EISENBARTH,E. et al. Interaction between cells and titanium surfaces. **Biomolecular Engineering**, v.19, p. 243-249, 2002.
55. ERCOLI,C. et al. The influence of Drill Wear on Cutting Efficiency and Heat Production During Osteotomy Preparation for Dental Implants: A Study of Drill Durability. **It J Oral Maxillofac Implants**, v.19, p.335-349, 2004.
56. ERICSSON,I. et al. Immediate functional loading of Branemark single tooth implants. An 18 months clinical pilot follow-up study. **Clin Oral Impl Res**, v.11, p.26-33, 2000.
57. FROST,H.M. Skeletal Structural Adaptations to Mechanical Usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's Law: The Bone Modeling Problem. **Anat Rec**, v. 226, p. 403-413, 1990.
58. FROST,H.M. Some ABC's of Skeletal Patophysiology. 5. Microdamage Physiology. **Calcif Tissue Int**, v.49, p.229-231, 1991.

59. FROST,H.M. Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians. **Angle Ortod**, v.63, n.3, p.175-188, 1994.
60. GALAN JÚNIOR,J. Bases Química, Física e Mecânica e In: GALAN JÚNIOR,J. **Materiais Dentários: O essencial para o estudante e clínico geral**. São Paulo, Editora Santos, 1999, Cap. 2, p.03-17 .
61. GANONG,W.F. In Ganong,W.F. **Fisiologia médica**,5a ed. São Paulo – SP, Atheneu Editora, Cap.21, p.333-344, 1989.
62. GAPSKI,R et al. Critical review of immediate implant loading. **Clin Oral Impl Res**, v.14, p.515-527, 2003.
63. GARNER,J.P. Tissue engineering and trauma surgeon. **Trauma**, v.4, p.177-183, 2002.
64. GEURS,N.C. et al., Influence of Implant Geometry and Surface Characteristics on Progressive Osseointegration. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.17, p.811-815, 2002.
65. GOTFREDSEN,K et al. Histomorphometric and removal torque analysis for TiO₂-blasted titanium implants. An experimental study in dogs. **Clin Oral Impl Res**, v.3, p.77-84, 1992.
66. GOLDHABER,P. Remodelling Bone in Tissue Culture. **J Dent Res**,v.45, n.3, p.490-4999, 1966.
67. GROESSNER-SCHREIBER,B. e 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.
68. GROESSNER-SCHREIBER,B. et al. Focal adhesion contact formation by fibroblasts cultured on surface modified dental implants. **Clin Oral Impl Res**. v.17, p. 736-745, 2006.
69. GÜRPINAR,Ö.A. e ONUR,M.A., *In Vitro* Investigation of Cell Compatibility of Pure β -TCP Granules, **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, n.20, p.183-196, 2005.

70. HALL,V.J.; STOJKOVIC,P.; STOJKOVIC,M. Using Therapeutic Cloning to Fight Human Disease: A Conundrum or Reality? **Stem Cells**, v.24, p.1628-1637, 2006.
71. HANSSON,S. Implant-Abutment Interface: Biomechanical Study of Flat Top versus Conical. **Clin Oral Impl Res**, v.2,p.33-41, 2000.
72. HARRIS,B.H; KOHLES,S.S. Effects of Mechanical and Thermal Fatigue on Dental Drill Performance. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.16, p. 819-826, 2001.
73. HERZOG,E.L.; KRAUSE,D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v.102, p.3483-3493, 2003.
74. HING,K.A. Bone repair in twenty-first century: biology, chemistry or engineering? **Phil Trans R Soc Lond A**, v.362, p.2821-2850, 2004.
75. ICHINOSE,S et al. The study of metal ion release and cytotoxicity in Co-Cr-Mo and Ti-Al-V alloy in a total knee prosthesis – scanning electron microscopic observation. **JMS**, v.14, n.1, p.79-86, 2003.
76. JAFFIN,R.A. e BERMAN,C.L. The excessive Loss of Branemark Fixtures in Type IV Bone: A 5 year Analysis. **J of Periodontol**, v.62, p.2-4, 1991.
77. JUNQUEIRA,L.C.; CARNEIRO,J. Tecido Ósseo In JUNQUEIRA,L.C. e CARNEIRO,J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A. Cap.8, p.132-155, 1973.
78. KAABECHE,K. Cbl-mediated ubiquitination of $\alpha 5$ integrin subunit mediates fibronectin-dependent osteoblast detachment and apoptosis induced by FGR2 activation. **Jounal of Cell Science**, v.118, p.1223-1232, 2005.
79. KAHN,H. Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise Química. Polytechnic School of São Paulo. University Technological; Characterization Lab., Mining Egeineering Dept: 1-11, 2007.
80. KAPANEN,A. **Biocompatibility Orthopaedic Implants on Bone Forming Cells**. Department of Anatomy and Cell Biology, and Biocenter Oulu, University of Oulu, 2002. Thesis., Oulun Yliopisto, Oulu, 2002.

81. KASEMO,B e LAUSMAA,J. Material-Tissue Interfaces: The role of the surface Properties and Processes. **Environ Health Perspect**, v.102, n.5, p.41-45, 1994.
82. KELLER,J.C. Physical and Biologic Characteristics of Implant Materials. **Adv Dent Res**, n.13, p.5-7, 1999.
83. KENNEDY,S.B. et al. Combinatorial scree of the effect of surface energy on fibronectin-mediated osteoblast adhesion, spreading and proliferation. **Biomaterials**, v.27, p.3817-3824, 2006.
84. KLINEBERG,I e MURRAY,G. Osseoperception: Sensory Function and Proprioception. **Adv Dent Res**, v.13, p.120-129, 1999.
85. KUMARI,T.V. et al. Cell surface interactions in the study of biocompatibility. **Trends Biomater Artif. Organs**. V.15, n.2, p.37-41, 2002.
86. LARSSON,C. et al. Bone response to surface modified titanium implants – studies on the tissue response after 1 year to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. **JMS** ,v.8, p.721-729, 1997.
87. LIM,J.Y. e DONAHUE,H.J. Biomaterial characteristics important to skeletal tissue engineering. **J Musculoskel Neuron Interact**, v.4, n.4, p.396-398, 2004.
88. LIMA,C. et al. Olfactory Mucosa Autografts in Human Spinal Cords Injury: A Pilot Clinical Study. **J Spinal Cord Med**. n.29, p.191-203, 2006.
89. LELES, C.R. Princípios de bioestatística. In: Carlos Estrela – Metodologia científica - ensino e pesquisa em odontologia. Artes Médicas – São Paulo – , 2001.
90. LEMONS,J.E.; PHILLIPS,R.W. Biomaterials for Dental Implants. In MISCH,C.E. **Contemporary Implant Dentistry**. St Louis. Mosby. Part II: Fundamental Sciences. Chapter 14, p.259-278, 1993.
91. LORENZONI,M. Immediate loading of single-tooth implants in anterior maxilla. Preliminary results after one year. **Clin Oral Impl Res**, v.14, p.180-187, 2003.

92. LUMBIKANONDA,N.; SAMMONS,R. Bone Cell Attachment to Dental Implants of Different Surfaces Characteristics. **Int J Oral Maxillofac implants**, v.16, p.627-636, 2001.
93. LUNDSTROM,I. E TENGVALL,P. Surfaces Properties and Osseointegration. In BRANEMARK,P-I **The Osseointegration Book: From Calvarium to Calcaneus**. Berlim, Quintessenz Verlags-GMBH, Chapter 5, p.133-148, 2005.
94. MATTIOLLI-BELMONTE,M. et al. Mesenchymal Stem Cells on Plasma-Deposited Acrylic Acid Coatings: An *in Vitro* Investigation to Improve Biomaterial Performance in Bone Reconstruction. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v.20, p.343-360, 2005.
95. McKIBBIN,B. The biology of fracture healing in long bones. **J Bone Surg**, v.60, p.150-162, 1978.
96. McMILLAN,P.J., et al. Variables that influence the Relationship Between Osseointegration and Bone Adjacent to an Implant. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.15, p.654-661, 2000.
97. McNAUGHT,A.D.; WILKINSON,A. IUPAC Compendium of Chemical Terminology, Online version. 2nd Edition 1997. Disponível em: <http://www.iupac.org/goldbook/C01290.pdf> Acesso em 09/06/2007 às 21:57h.
98. MERRY,K. et al., Expression of osteopontin mRNA by osteoclasts and osteoblasts in modelling adult human bone. **Journal of Cell Science**, v.104, p.1013-1020, 1993.
99. MEYER,U; MEYER,T.; JONES,D.B. Attachment kinetics, proliferation rates and vinculin assembly of bovine osteoblasts cultured on t pre-coated artificial substrates. **Journal of Material Sciences: materials in Medicine**, v.9, p. 301-307, 1998.
100. MEYER,U. et al. Early Tissue Reaction at the Interface of Immediately Loaded Dental Implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.18, p.489-499, 2003.

101. MEYER,U. et al. Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. **European Cells and Materials**, v.9, p.39-49, 2005.
102. MICULESCU,F et al. Experimental Researches Concerning Metabolic Chemical Phenomenon At the Bone Tissue-Metallic Implant Interface. **European Cells and Materials**, v.1, n.9, p.29-30, 2005.
103. MURAGLIA,A.; CANCEDDA,R.; QUARTO,R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to hierarquical model. **Journal of Cell Science**, v.113, p.1161-1166, 2000 .
104. MUSCHLER,G.F.; MIDURA,R.J.; NAKAMOTO,C. Practical Modeling Concepts for Connective Tissue Stem Cell and Progenitor Compartment Kinetics. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.3, p.170-193, 2003.
105. MUSCHLER,G.F.; NAKAMOTO,C.; GRIFFITH,L.G. Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering, **J Bone Joint Surg Am.** v.86, p.1541-1558, 2004.
106. NAMEN,F.M. et al. Wettability of some dental aesthetic materials containing fluor after surface finishing treatments. **Stoma**, v.68, p. 5-11, 2003 [a].
107. NAMEN,F.M et al. Evaluation of superficial roughness and topographical analisys of the dental polymeric materials. **Proceedings of the XIX Congress of the Brazilian Society of Microscopy and Microanalisys**. M0806-008, 2003 [b]
108. NAMEN, FÁTIMA MARIA. **Elaboração de Teses e Dissertações**. Rio de Janeiro: Rubio, 2006.
109. NECCHI,S. et al. The Effect of Fixture Neck Design in a Realistic Model os Dental Implant: A Finite Element Approach. **Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engieneering**, v.6, n.5-6, p.289-297, 2003.
110. NIZNICK,G.A., Achieving Osseointegration in Soft Bone: The Search for Improved Results. **Oral Health. Product Profile. Paragon Implant Company**, p.27-32, 2000.

111. NKENKE,E. et al. Bone contact, growth, and density around immediately loaded implants in the mandible of mini pigs. **Clin Oral Impl Res**, v.14, 312-321, 2003.
112. NODA,M e CAMILLIERE,JJ, / *Vivo* Stimulation of Bone Formation by Transforming Growth Factor-Beta, **Endocrinology**, v.124, p.2991-2994, 1989.
113. ORSINI,G. et al. Surface Analysis of Machined Versus Sandblasted and Acid-Etched Titanium Implants. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.15, p.779-784, 2000.
114. PARKER,E.; SHIGA,A.; DAVIES,J.E. Growing Human Bone In Vitro In **Bone Engineering**, Based on the proceedings of the bone engineering workshop held in Toronto, Ontário, December 2-3, 1999. Hong Kong, Rainbow Graphic and Printing LTD. Chapter 6, p.63-77, 2005.
115. PERALA,D. e CHAPMAN,R. Complement Activation by Dental Implants. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.6, p.136-141, 1991.
116. PLACKO,H.E. et al. Surface Characterization of Titanium-Based Implant Materials, **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.15, p.355-363, 2000.
117. POSTIGLIONE,L. et al. Behaviour of SaOS-2 Cells Cultured on Different Titanium Surfaces. **J Dent Res**, v. 82, n.9, p.692-696, 2003.
118. PURPURA,K.A.; AUBIN,J.E.; ZANDSTRA,P.W. Sustained In Vitro Expansion of Bone Progenitors Is Cell Density Dependent. **Stem Cells**, v.22, p.39-50, 2004.
119. RAJARAMAN,R. et al. A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. **Exp Cell Res**, v.88, p.327-339, 1974.
120. RAMP,L.C. e JEFFCOAT R. Dynamic Behaviour of Implants as a Measure of Osseointegration. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.16, p.637-645, 2001.
121. REKOW,D. Informatics Challenges in Tissue Engineering and Biomaterials. **Adv Dent Res**, v.17, p.49-54, 2003.
122. REUTER,K.; SCHEFFLER,M. Composition, structure, and stability of Ru O₂(110) as a function of oxygen pressure. **PhysRevB**, v.65, p.0354061-11,2001.

123. ROBERTS,W.E., et al. Bone physiology and metabolism in dental implantology: risk factors for osteoporosis and other metabolic diseases. **Impl Dent** , v.1, p.11-21,1992.
124. ROBERTS,W.E.; GARETTO,L.P.; BREZNIAK,N. Bone Physiology and Metabolism. In MISCH,C.E. **Contemporary Implant Dentistry**. St Louis. Mosby. Part II: Fundamental Sciences. Chapter 16, p.327-354, 1993.
125. ROGERS,S.D., et al. In vitro human monocyte response to wear particles of titanium alloycontaining vanadium or niobium. **J Bone Joint Surg**, v.79-b, 311-315, 1997.
126. ROSA,A.L.; BELOTI,M.M. Rat bone marrow cell response to titanium alloy with different surface roughness. . **Clin Oral Impl Res**, v.14, p.43-48, 2003.
127. RUPP,F. et al. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. **J Biomed Mater Res**, 2006.
128. SAAD,P.A. et al. Complicações com Técnica de Função Imediata. In CARVALHO,P.S.P., et al. Gerenciando os Riscos e Complicações em Implantodontia. São Paulo. Livraria Editora Santos Ltda., 2007.
129. 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.
130. ŞAHIN,S. et al. The influence of functional forces on the biomechanics of implant-supported prostheses - a review. **J of Dentistry**, v.30, p.271-282, 2002.
131. 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.
132. SATOU,J. et al. Streptococcal Adherence on various restorative materials. **J Dent Res**, v.67, n.3, p.588-591, 1988.

133. SCHNEIDER,G.B. et al. Implant Surface Roughness Affects Osteoblast Gene Expression. **J Dent Res**, v.82, n.5, p. 372-376, 2003.
134. SCHWARTZ,Z. et al. Implant Surface Characteristics Modulate Differentiation Behaviour of Cells in the Osteoblastic Lineage. **Adv Dent Res**, v.13, p.38-48, 1999.
135. SEEMANN,R. et al. Wetting morphologies of microstructured surfaces. **PNAS** v.102, p. 1848-1852, 2005.
136. SHU LEE,H et al. Multipotential Mesenchymal Stem Cells from Femoral Bone marrow Near the Site of Osteonecrosis. **Stem Cells**, v.21, p.190-199, 2003.
137. SKALAK,R. Biomechanical considerations in osseointegrated prostheses. **J Prosthet Dent**, v.49, p.843-848, 1983.
138. SLOTTE,C. et al. Influence of preimplant surgical intervention and implant placement on bone wound healing. **Clin Oral Impl Res**, v.14, p. 528-534, 2003.
139. SMITH,D.C. Dental implants: Materials and design considerations. **Int J Prosthodont**, v.6, p.106-117, 1993.
140. SPIEKERMANN, H. Introdução. In SPIEKERMANN, H. et al. **Implantologia**. Porto Alegre, Editora Artes Médicas do Sul LTDA. Cap. 1, p. 1-10, 2000.
141. STEENBECKER,G.O Fundamentos de la adhesión dental. In HENOSTROZA,H. **Adhesión en Odontología Restauradora**. Editora Maio, Curitiba, PR, Cap.2, p.27-52, 2003.
142. STENPORT,V.F. et al. Failure to induce supracrestal bone growth between and around partially inserted titanium implants using bone morphogenetic protein (BMP): an experimental study in dogs. **Clin Oral Impl Res**, v.14, p.219-225, 2003.
143. STEVENS,M.M. et al. In vivo engineering of organs: The bone bioreactor. **PNAS**, v.102, n.32, p.11450-1455, 2005.
144. SYKARAS,N. et al. Implant Materials, Designs, and Surface Topographies: Their Effect on Osseointegration. A Literature Review. **Int J Oral Maxillofac Implants**, V.15, p.675-690, 2000.

145. SZMUKLER-MONCLER,S. et al. Considerations preliminary to the application of early and immediate loading protocols in dental implantology. **Clin Oral Impl Res**, v.11, p.12-25, 2000.
146. TAICHMAN,R.S.; EMERSON,S.G. The Role of Osteoblasts in the Hematopoietic Microenviroment. **Stem Cells**, v.16, p.7-15, 1998.
147. TERMINE,J.D. et al. Osteonectin, a bone-specific protein linkin mineral to collagen. **Cell**. V.26, p.99-105, 1981.
148. THOMAS,K.A.; COOK,S.D. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. **J Biomed Mater Res**, v.19, p. 875-901, 1985.
149. TULI,R. et al. Characterization of Multipotential Mesenchymal Progenitor Cells Derived from Human Trabecular Bone. **Stem Cells**, v.21, p.681-693, 2003.
150. UEHARA,T.; TAKAOKA,K . e ITO,K. Histological evidence of osseointegration in human retrieved fractured hydroxyapatite-coated screw type implants: a case report. **Clin Oral Impl Res**, v.15, p.540-545, 2004.
151. UNITED STATES OF AMERICA. Stem Cell Information. The National Institutes of Health (NIH) resource for stem cell research. Information on Eligibility Criteria for Federal Funding of Research on Human Embryonic Stem Cells. 2001. Disponível em: <http://stemcells.nih.gov/StaticResources/research/registry/PDFs/EligibilityCriteria.pdf>> Acesso em: 05/05/2007 às 20:36h.
152. UNITED STATES OF AMERICA. Stem Cell Information. The National Institutes of Health (NIH) resource for stem cell research. 2007. Disponível em: <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics5.asp>> Acesso em 05/05/2007 às 21:20.
153. VAN DAMME,A. et al. Bone Marrow Stromal Cells as Targets for Gene Therapy. **Current Gene Therapy**, v.2,p.195-209, 2002.
154. VAN OSS,C.J.; GIESE,R.F.; DOCOSLIS,A. A Water, treated as the continuous liquid in and around cells. **Cellular and Molecular Biology**, v.47, n.5, p.721-733, 2001.

155. VOGLER,E.A. Water and the acute biological response to surfaces. **J Biomater Sci Polym**, v.10, p.1015-1045, 1999.
156. WAGNER et al. Quantitative assesment to the structural basis of water repellency in natural and technical surfaces. **J Exp Bot**; 54, p. 1295-1303, 2003
157. WENNERBERG,A. et al. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. **Clin Oral Impl Res**, v.6, p.24-30, 1995.
158. WENNERBERG, Ann. **On Surface Roughness and Implant Incorporation**. Department of Biomaterials/Handicap Research, Institute for surgical Sciences, and Department of Prosthetic Dentistry, Goteborg University, 1996. Thesis. Goteborg, Sweden, 1996.
159. WENNERBERG et al. Titanium release from implants prepared with different surface roughness, An *in vitro* and *in vivo* study. **Clin Oral Impl Res**, v.15, p.505-512, 2004.
160. WISKOTT,H.W.A. e BELSER,U.C. Lack of integration of smooth titanium surfaces: a working hypothesis based on strains generated in the surrounding bone. **Clin Oral Impl Res**, v.10, p.429-444, 1999.
161. XIONG,Z. et al. Fabrication of Porous Scaffolds for Bone Egeineering via low-temperature Deposition, **Scripta Materialia**, v.46, n.11, p. 771-776, 2002.
162. YAMADA,Y. et al. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. **Clin Oral Impl Res**, v.15, p.589-597, 2004.
163. YAMATE,T. et al. Osteopontin Expression by Osteoclast and Osteoblast Progenitors in the Murine Bone Marrow: Demonstration of Its Requirement for Osteoclastogenesis and Its Increase After Ovariectomy. **Endocrinology**, v.138, p.3047-3055, 1997.
164. YAN,Y. et al. Direct Construction of a Three-dimensional Structure with Cells and Hydrogel. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v.20, p.259-269, 2005.

165. TAVARES et al. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H₂SO₄/H₂O₂ enhances contact osteogenesis. **Clin Oral Impl Res**, v.18, 452-458, 2007.
166. ZHAO,G. et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. **J Biomed Mater Res**, v.74A, n.1, p.49-58, 2005.
167. ZINGER,O. et al. Time-Dependent Adhesion and Morphology of Osteoblastic Cells on Titanium Model Surfaces Featuring Scale-Dependent Topography. **European Cells an Materials**,v.5,n.1,p.21-23, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICES

Apêndice A – Dados relativos aos valores obtidos na análise estatística

| | perfil liso | perfil rugoso |
|----------------------|-------------|---------------|
| Number of values | 7 | 7 |
| Minimum | 296 | 1410 |
| 25% Percentile | 813 | 2216 |
| Median | 1106 | 2940 |
| 75% Percentile | 1143 | 4653 |
| Maximum | 2286 | 5113 |
| Mean | 1097 | 3144 |
| Std. Deviation | 603 | 1309 |
| Std. Error | 227,9 | 494,6 |
| Lower 95% CI of mean | 539,5 | 1934 |
| Upper 95% CI of mean | 1655 | 4354 |
| Sum | 7680 | 22009 |

Quadro 1 – Média, desvio padrão e erro padrão (perfilometria)

| | Parameter | Value |
|-----------|--|----------------|
| | | Y |
| 1 | Table Analyzed | Data 1 |
| 2 | Column A | perfil Mq |
| 3 | vs | vs |
| 4 | Column B | perfil ST |
| 5 | | |
| 6 | Wilcoxon signed rank test | |
| 7 | P value | 0.0156 |
| 8 | Exact or approximate P value | Exact |
| 9 | P value summary | * |
| 10 | Are medians signif different? (P<0.05) | Yes |
| 11 | One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| 12 | Sum of positive, negative ranks | 0.0000, -28.00 |
| 13 | Sum of signed ranks (W) | -28.00 |
| 14 | | |
| 15 | How effective was the pairing? | |
| 16 | rs (Spearman) | 0.0714 |
| 17 | P Value (one tailed) | 0.4532 |
| 18 | P value summary | ns |
| 19 | Was the pairing significantly effective? | No |

Quadro 2 – Teste de Wilcoxon aplicado ao quadro 1 (perfilometria)

| | | A | B |
|-----------|------------------------------------|------------------------|------------------------|
| | | Mq | ST |
| | | Y | Y |
| 1 | Number of values | 27 | 27 |
| 2 | | | |
| 3 | Minimum | 0.0 | 1.000 |
| 4 | 25% Percentile | 2.000 | 4.000 |
| 5 | Median | 5.000 | 5.000 |
| 6 | 75% Percentile | 10.00 | 7.000 |
| 7 | Maximun | 17.00 | 13.00 |
| 8 | | | |
| 9 | Mean | 5.852 | 5.370 |
| 10 | Std Deviation | 4.391 | 2.857 |
| 11 | Std Error | 0.8451 | 0.5499 |
| 12 | | | |
| 13 | Lower 95% CI of mean | 4.115 | 4.240 |
| 14 | Upper 95% CI of mean | 7.589 | 6.501 |
| 15 | | | |
| 16 | Normality Test | | |
| 17 | KS distance | 0.1695 | 0.2182 |
| 18 | P value | P>0.10 | P>0.10 |
| 19 | Passed normality test (alpha=0.05) | Yes | Yes |
| 20 | P value summary | ns | ns |
| 21 | | | |
| 22 | One sample t test | | |
| 23 | Theoretical mean | 0.0 | 0.0 |
| 24 | Actual mean | 5.852 | 5.370 |
| 25 | Discrepancy | -5.852 | -5.370 |
| 26 | 95% CI of discrepancy | 4.114 to 7.589 | 4.240 to 6.501 |
| 27 | t.df | t=6.924 df=26 | t=9.766 df=26 |
| 28 | P value (two tailed) | P<0.0001 | P<0.0001 |
| 29 | Significant (alpha=0.05) | Yes | Yes |
| 30 | | | |
| 31 | Wilcoxon Signed Rank Test | | |
| 32 | Theoretical median | 0.0 | 0.0 |
| 33 | Actual median | 5.000 | 5.000 |
| 34 | Discrepancy | -5.000 | -5.000 |
| 35 | Sum of signed ranks (W) | 351.0 | 378.0 |
| 36 | Sum of positive ranks | 351.0 | 378.0 |
| 37 | Sum os negative ranks | 0.0 | 0.0 |
| 38 | P value (two tailed) | P<0.0001 | P<0.0001 |
| 39 | Exact or estimate? | Gaussian Approximation | Gaussian Approximation |
| 40 | Significant (alpha=0.05)? | Yes | Yes |
| 41 | | | |
| 42 | Sum | 158.0 | 145.0 |

Quadro 3 – Média, desvio padrão e erro padrão (contagem de células)

| | Parameter | A Value Y |
|-----------|---|------------------------|
| 1 | Table Analyzed | Data1 |
| 2 | Column A | Mq |
| 3 | vs | vs |
| 4 | Column B | ST |
| 5 | | |
| 6 | Mann Whitney test | |
| 7 | P value | 0.9241 |
| 8 | Exact or approximate P value | Gaussian Approximation |
| 9 | P value summary | ns |
| 10 | Are medians signif. Different? (P<0.05) | No |
| 11 | One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| 12 | Sum of ranks in column A,B | 736.5, 748.5 |
| 13 | Mann-Whitney U | 358.5 |

Quadro 4 – Teste de Mann Whitney aplicado ao quadro 3 (contagem de células)

| | | | | |
|----------------------|-------|-------|-------|--------|
| Number of values | 58 | 66 | 47 | 32 |
| Minimum | 46,77 | 20,62 | 49,36 | 43,78 |
| 25% Percentile | 66,12 | 50,86 | 67,63 | 51,85 |
| Median | 80,82 | 54,19 | 72,65 | 53,96 |
| 75% Percentile | 88,64 | 69,23 | 82,23 | 55,85 |
| Maximum | 112,6 | 122,3 | 116,9 | 60,92 |
| Mean | 79,04 | 60,95 | 76,16 | 53,76 |
| Std. Deviation | 15,06 | 19,27 | 13,49 | 4,166 |
| Std. Error | 1,978 | 2,371 | 1,967 | 0,7365 |
| Lower 95% CI of mean | 75,08 | 56,22 | 72,2 | 52,26 |
| Upper 95% CI of mean | 83 | 65,69 | 80,12 | 55,26 |
| Sum | 4584 | 4023 | 3579 | 1720 |

Quadro 5 – Ângulo de contato (ANOVA)

| | | | | |
|--|------------|-------|----------|-----------------|
| Data 1 | | | | |
| One-way analysis of variance | | | | |
| P value | P<0.0001 | | | |
| P value summary | *** | | | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | | | |
| Number of groups | 4 | | | |
| F | 28,73 | | | |
| R squared | 0,3022 | | | |
| Bartlett's test for equal variances | | | | |
| Bartlett's statistic (corrected) | 60,86 | | | |
| P value | P<0.0001 | | | |
| P value summary | *** | | | |
| Do the variances differ signif. (P < 0.05) | Yes | | | |
| ANOVA Table | | | | |
| | SS | df | MS | |
| Treatment (between columns) | 19910 | 3 | 6635 | |
| Residual (within columns) | 45960 | 199 | 231 | |
| Total | 65870 | 202 | | |
| Tukey's Multiple Comparison Test | | | | |
| | Mean Diff. | q | P value | 95% CI of diff |
| Ti liso gli vs Ti poroso gli | 18,08 | 9,35 | 0.001 | 10.96 to 25.21 |
| Ti liso gli vs Ti liso agua | 2,879 | 1,365 | P > 0.05 | -4.890 to 10.65 |
| Ti liso gli vs Ti poroso agua | 25,28 | 10,68 | 0.001 | 16.56 to 33.99 |
| Ti poroso gli vs Ti liso agua | -15,2 | 7,413 | 0.001 | 7.649 |
| Ti poroso gli vs Ti poroso agua | 7,191 | 3,107 | P > 0.05 | -1.335 to 15.72 |
| Ti liso agua vs Ti poroso agua | 22,4 | 9,094 | 0.001 | 13.32 to 31.47 |

Quadro 6 – Teste de Tukey – Ângulo de contato

APÊNDICE B – Contagem de células sobre as superfícies Mq e ST, realizadas em 06 corpos de prova (03 Mq e 03 ST)

| Amostra | no células totais |
|---------|-------------------|
| La18h | 89 |
| La18h | 57 |
| La18h | 62 |
| La18h | 64 |
| La18h | 71 |
| La18h | 62 |

Amostras e no de células por quadrante (q)

| | | | |
|-------|----|-------|----|
| La18h | | Ra18h | |
| q.a= | 1 | q.a= | 4 |
| q.b= | 2 | q.b= | 2 |
| q.c= | 3 | q.c= | 5 |
| q.d= | 9 | q.d= | 4 |
| q.e= | 10 | q.e= | 5 |
| q.f= | 10 | q.f= | 7 |
| q.g= | 11 | q.g= | 11 |
| q.h= | 17 | q.h= | 5 |
| q.i= | 9 | q.i= | 9 |
| q.j= | 13 | q.j= | 5 |
| q.k= | 5 | q.k= | 4 |
| q.l= | 0 | q.l= | 3 |

| | | | |
|-------|----|-------|----|
| Lb18h | | Rb18h | |
| q.a= | 2 | q.a= | 4 |
| q.b= | 1 | q.b= | 6 |
| q.c= | 2 | q.c= | 3 |
| q.d= | 3 | q.d= | 8 |
| q.e= | 2 | q.e= | 1 |
| q.f= | 7 | q.f= | 7 |
| q.g= | 11 | q.g= | 8 |
| q.h= | 8 | q.h= | 9 |
| q.i= | 10 | q.i= | 13 |
| q.j= | 4 | q.j= | 2 |
| q.k= | 2 | q.k= | 4 |
| q.l= | 5 | q.l= | 5 |

| | | | |
|-------|----|-------|----|
| Lc18h | | Rc18h | |
| q.a= | 3 | q.a= | 1 |
| q.b= | 1 | q.b= | 2 |
| q.c= | 6 | q.c= | 4 |
| q.d= | 5 | q.d= | 7 |
| q.e= | 3 | q.e= | 9 |
| q.f= | 6 | q.f= | 10 |
| q.g= | 11 | q.g= | 6 |
| q.h= | 6 | q.h= | 10 |
| q.i= | 7 | q.i= | 4 |
| q.j= | 7 | q.j= | 4 |
| q.k= | 3 | q.k= | 5 |
| q.l= | 4 | q.l= | 0 |

ANEXOS

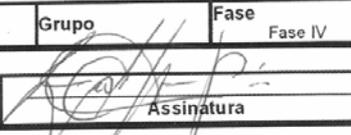
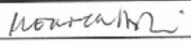
ANEXOS

ANEXO A – Certificado de apresentação do projeto de pesquisa ao CEP/UVA.

CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética Página 1 de 2



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

| | | | |
|---|--|--|-------------|
| PROJETO RECEBIDO NO CEP | | CAAE - 0006.0.309.000-07 | |
| Projeto de Pesquisa AVALIAÇÃO IN VITRO DA ADESÃO OSTEOLÁSTICA SOBRE UMA SUPERFÍCIE TRATADA DE IMPLANTE DENTÁRIO | | | |
| Área(s) Temática(s) Especial(s) | | Grupo | Fase |
| Novos Procedimentos | Biossegurança | Genética Humana | Fase IV |
| Pesquisador Responsável | | | |
| CPF 95839321753 | Pesquisador Responsável Luis Eduardo Carneiro Campos |  Assinatura | |
| Comitê de Ética | | | |
| Data de Entrega 21/06/2007 | Recebimento:  Assinatura | | |

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.

ANEXO B– Folha de aprovação do projeto de pesquisa (CEP/UVA).

COORDENAÇÃO DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rio de Janeiro, 29 de Junho de 2007

Resolução nº 78/07

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Veiga de Almeida em reunião do dia 29 de Junho de 2007 avaliou seu projeto de pesquisa com seres humanos denominado "Avaliação in vitro da adesão osteoblástica sobre uma superfície tratada de implante dentário" sob número **78/07** e o considerou **aprovado sem risco** e com necessidade de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Luis Eduardo Carneiro Campos


Prof. Dra. Mônica Medeiros de Britto Pereira
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Veiga de Almeida

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)