

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

CENTRO BIOMÉDICO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Antonio Carlos Canabarro Andrade Junior

**SUPERFÍCIES DE TITÂNIO COM DIFERENTES RUGOSIDADES E
QUANTIDADES DE ALUMINA: CARACTERIZAÇÃO E BIOCOMPATIBILIDADE
“IN VITRO” UTILIZANDO OSTEÓBLASTOS DERIVADOS DE OSSO ALVEOLAR
HUMANO**

Rio de Janeiro

2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Antonio Carlos Canabarro Andrade Junior

**SUPERFÍCIES DE TITÂNIO COM DIFERENTES RUGOSIDADES E QUANTIDADES
DE ALUMINA: CARACTERIZAÇÃO E BIOCOMPATIBILIDADE “IN VITRO”
UTILIZANDO OSTEÓBLASTOS DERIVADOS DE OSSO ALVEOLAR HUMANO**

**Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia da UERJ como um dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Periodontia.**

**Orientadores: Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer
Profa. Dra. Marília Garcia Diniz**

Rio de Janeiro

2006

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

- A553 Andrade Junior, Antonio Carlos Canabarro.
Superfícies de titânio com diferentes rugosidades e quantidades de alumina: caracterização e biocompatibilidade “in vitro” utilizando osteoblastos derivados de osso alveolar humano / Antonio Carlos Canabarro Andrade Junior. – 2006.
96 f.
- Orientador: Ricardo Guimarães Fischer.
Co-orientadores: Marília Garcia Diniz.
Tese (Doutorado em Periodontia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.
1. Propriedades de superfície. 2. Processamento de imagem assistida por computador. 3. Titânio. 4. Óxido de alumínio. 5. Osteoblastos. I. Fischer, Ricardo Guimarães. II. Diniz, Marília Garcia. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.
- CDU
616.314

FOLHA DE APROVAÇÃO**Antonio Carlos Canabarro Andrade Junior****SUPERFÍCIES DE TITÂNIO COM DIFERENTES RUGOSIDADES E
QUANTIDADES DE ALUMINA: CARACTERIZAÇÃO E BIOCOMPATIBILIDADE
“IN VITRO” UTILIZANDO OSTEÓBLASTOS DERIVADOS DE OSSO ALVEOLAR
HUMANO****Rio de Janeiro, 28 de abril de 2006.**

Professor Adalberto Luiz Rosa

Professor Eduardo Muniz Barreto Tinoco

Professor Henrique Teixeira

Professora Lais de Carvalho

Professor Walter Augusto Soares Machado

DEDICATÓRIA

Para a minha querida esposa Marcia, pelo seu amor e por todo apoio que tem me dedicado ao longo desses anos. E para a Clara, nossa filha, por ter iluminado as nossas vidas.

Para os meus pais, Antonio e Rosa, por terem me preparado para esse mundo, estimulando a leitura desde cedo e sempre mostrando o caminho do bem.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Ricardo Guimarães Fischer, pelo valioso apoio na minha formação e, principalmente, por ter me orientado neste trabalho.

À Professora Doutora Marília Garcia Diniz, pela orientação decisiva na definição dos objetivos, além da participação ativa no desenvolvimento inicial desta tese e na caracterização das superfícies.

Ao Professor Doutor Walter Augusto Soares Machado, meu mentor e principal responsável pela minha escolha pelo magistério. Meu profundo agradecimento.

À Professora Doutora Lais de Carvalho, que abriu as portas do seu Laboratório (de Cultura de Células da UERJ) e me estimulou a buscar novos caminhos, que me levaram a Ribeirão Preto.

Ao Professor Doutor Adalberto Rosa, pela inestimável ajuda ao permitir que eu desenvolvesse a parte de cultura de células em seu Laboratório (de Cultura de células, FORP / USP).

Ao Professor Doutor Marcio Beloti, pela ajuda preciosa em toda a parte de cultura de células (FORP / USP), possibilitando o desfecho desta tese, além de vários ensinamentos valiosos.

Ao Professor Doutor Sidnei Paciornik (PUC DCMM/ RJ) pela ajuda crucial na quantificação da alumina e da matriz calcificada no programa KS400.

Ao Professor Doutor Paulo Tambasco (FORP / USP) pela imunofluorescência.

A CELMA / GE pelo jateamento das amostras.

Aos técnicos Junia Ramos e Roger Fernandes, do Laboratório de cultura de células da FORP/USP, pela ajuda no experimento.

Ao técnico Antonio Godoy (Laboratório de Engenharia Mecânica / UERJ) pelo corte das amostras.

Aos responsáveis pelo Laboratório de Engenharia Sanitária da UERJ, por permitirem o uso das suas instalações para o preparo das amostras.

Ao Professor Doutor Hélio Sampaio, por ter colocado a minha disposição os materiais e instrumentais do Laboratório de Materiais Dentários da FO/UERJ.

Aos meus colegas, Professores de Periodontia da FO/UERJ, Eduardo Tinoco, Paulo Gonçalo, Tânia Galhego, Mariliza Terezan, Marcelo Figueredo e Eduardo Dias, pelo convívio em harmonia.

À Pós-Graduação da FO/UERJ, pelo financiamento parcial desta pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na confecção deste trabalho

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de superfícies de titânio (Ti), com diferentes rugosidades e quantidades de alumina, na adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos derivados de osso alveolar humano (OAH), e na formação de matriz mineralizada. Amostras de Ti foram lixadas (lixa Sic 600) ou jateadas com alumina (grãos de 65 μm e pressão de 414 kpa) e submetidas a ataque duplo com ácido fluorídrico (HF) a 4% por 13 s ou 60 s, seguido de tratamento com solução de HF a 4% e H_2O_2 a 8%, por 15 s. Cinco superfícies foram avaliadas (L - lixada, L1 - lixada e atacada por HF por 60 s, J - jateada, J1 - jateada e atacada por HF por 13 s e J2 - jateada e atacada por HF por 60 s). OAHs foram isolados e cultivados sobre 4 amostras de cada superfícies (2×10^4 células/poço). O número de células aderidas, após 24 h, foi contado em um hemocitômetro. A viabilidade celular, aos 10 dias, foi avaliada pelo corante azul da tripan. A proliferação celular foi calculada pelo “doubling time” (tempo necessário para o número de células dobrar entre 1 e 10 dias). A atividade de fosfatase alcalina (ALP) e o conteúdo de proteína total (CPT) foram avaliados, respectivamente, pela liberação de timolftaleína e pelo método modificado por LOWRY et al.⁶⁰, aos 7, 14 e 21 dias. A formação de matriz mineralizada foi estudada aos 21 dias de cultura, utilizando-se o corante vermelho de alizarina. A presença do Ca e P foi confirmada pela análise semiquantitativa (EDS). A área média ocupada pela matriz mineralizada foi estabelecida pelo KS400. As superfícies apresentaram rugosidades estatisticamente distintas ($p < 0.001$ ANOVA), em micrômetros (L= 0.25 ± 0.06 , L1= 0.52 ± 0.04 , J= 1.00 ± 0.07 , J1= 0.98 ± 0.03 e J2= 0.99 ± 0.08). O alumínio foi visualizado nas superfícies J e J1, e confirmado pelo EDS. A análise digital com o programa KS400 indicou que a área média ocupada pela alumina foi maior na superfície J do que na superfície J1 (respectivamente, $9,72\% \pm 0,50$ vs $0,22\% \pm 0,13$, $p < 0,0001$ - teste t). A adesão, proliferação e diferenciação dos OAHs não foram afetadas pelos diferentes tratamentos de superfícies ($p > 0.05$ ANOVA). Porém, a área de matriz mineralizada foi menor na superfície J, em relação às outras superfícies ($p < 0.0001$ ANOVA). Como esta superfície apresentou valores de rugosidade semelhantes a outras duas superfícies (J1 e J2), a presença de alumina, em maior quantidade na superfície J, parece ter afetado negativamente a mineralização da matriz, o que pode indicar um efeito deletério deste contaminante na formação óssea.

Palavras-chave: Propriedades de superfície, osteoblastos, processamento de imagem assistida por computador, titânio, alumina.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of titanium (Ti) with different surfaces and presence of alumina on adhesion, proliferation and differentiation of human alveolar bone cells (HBCs) and on matrix mineralization. Ti plates were ground (600 grit Sic paper), blasted (alumina) and submitted to a double chemical etched with 13 s or 60 s HF (4%) followed by 15 s treatment with HF (4%)/H₂O₂ (8%) for 15 s. 5 surfaces were evaluated (G - ground, G1 – ground and etched by 60 s HF (4%), B – blasted, B1 – blasted and etched by 13 s HF and B2 – blasted and etched by 60 s HF). Isolated HBCs were cultivated on surfaces (n= 4, 2 x 10⁴ cells/plate). Cell number after 24 h was counted on hemocytometer. Cell viability after 10 days was evaluated by tripan blue. Cell proliferation was calculated by doubling time (necessary period to fold cell number into two) between 1 and 10 days. Alkaline phosphatase (ALP) activity and total protein content (TPC) were evaluated by timolphthalein and modified method of LOWRY et al.⁶⁰ after 7, 14 and 21 days of culture. Mineralized matrix formation was studied after 21 days by alizarin red. The Ca and P presence was confirmed by semi quantitative analysis (EDS). The average area occupied by mineralized matrix was analyzed by KS400. Surfaces showed statistical distinct roughness (p< 0.001 ANOVA), (G= 0.25 ±0.06, G1= 0.52 ±0.04, B= 1.00 ±0.07, B1= 0.98 ±0.03 and B2= 0.99 ±0.08 micrometers). Aluminum was viewed on B and B1 surfaces and confirmed by EDS. Digital analysis was performed by KS400. The average area occupied by alumina was greater on B than on B1 (respectively, 9,72% (±0,50) vs 0,22%.(± 0,13), p< 0,0001 t test). Adhesion, proliferation and differentiation of HBCs were not affected by different surface treatment (p> 0.05). However, the average area of mineralized matrix was smaller on B surface than on other surfaces (p< 0.0001 ANOVA). B surface showed a rough value similar to B1 and B2 surfaces. Therefore, high quantity of alumina on B surface may be impaired the matrix mineralization, indicating a possible deleterious effect of alumina on bone formation.

Key-words: Surface properties, osteoblasts, Image processing, computer-assisted, surface treatments, titanium, alumina.

SUMÁRIO

1. Introdução	19
2. Revisão de literatura	22
2.1 Osteoblastos e a formação do tecido ósseo	22
2.2 Comportamento celular em diferentes superfícies de titânio	23
2.3 Superfícies de implantes: estudos “in vivo”	32
2.4 Influência de partículas residuais sobre tecidos e células	35
3. Proposição	46
4. Materiais e métodos	47
5. Resultados	59
6. Discussão	77
7. Conclusões	87
Referências	88
Apêndice – artigo publicado	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos micrográficos das superfícies de titânio. Figura 1A: sem tratamento. Figura 1B: lixada (L). Figura 1C: lixada e atacada com HF a 4% por 60 segundos (L1). Figura 1D: jateada com alumina (J). Figura 1E: jateada e atacada com HF a 4% por 13 segundos (J1). Figura 1F: jateada e atacada com HF a 4% por 60 segundos (J2). Aumento original: 200 X, modo SE. 60

Figura 2. Aspectos micrográficos das superfícies de titânio em maior aumento. Figura 2A: sem tratamento. Figura 2B: lixada (L). Figura 2C: lixada e atacada com HF a 4% por 60 segundos (L1). Figura 2D: jateada com alumina (J). Figura 1E: jateada e atacada com HF a 4% por 13 segundos (J1). Figura 2F: jateada e atacada com HF a 4% por 60 segundos (J2). Aumento original: 1000 X, modo SE. 61

Figura 3. Aspectos micrográficos das superfícies jateada (J – em A), jateada e atacada com HF por 13 segundos (J1 – em B) e jateada e atacada com HF por 60 segundos (J2 – em C). Notar as regiões escuras em A e B que correspondem à presença de contaminantes. Aumento original: 200 X, modo BSE. 63

Figura 4. Espectros de EDS das superfícies jateadas. Pode-se observar a presença de Al em A (grupo J) e em B (grupo J1). Em C, que corresponde à superfície jateada e atacada por HF a 4% por 60 segundos (grupo J2), este elemento não foi detectado. 65

Figura 5. Aspectos micrográficos das superfícies J e J1. Em A e B, imagens iniciais das superfícies. Em C e D, identificação das regiões acima de 15 pixels. Em E e F, inversão dos tons (claro/escuro - binarização) e quantificação da alumina. Aumento original: 200 X, modo BSE. 65

Figura 6. Aspectos morfológicos das células osteoblásticas nos diferentes materiais após 24 horas. Superfícies L (A e B), L1 (C e D), J (E e F), J1 (G e H) e J2 (I e J). Notar que não parece haver diferenças morfológicas nas superfícies distintas. De maneira geral, as células apresentam-se espalhadas (citoplasma em verde), com núcleos proeminentes e redondos (em azul), e aderidas (FN em vermelho). São observados numerosos contatos entre as membranas celulares de células adjacentes. Aumentos originais: 20 e 40 X (coluna da esquerda e coluna da direita, respectivamente). 67

Figura 7. Média (e DP) da adesão celular (n= 4). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (p= 0.12). 68

Figura 8. Valores médios (e DP) do doubling time (n= 4). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (p= 0.27). 69

Figura 9. Média (e DP) de células viáveis (n= 4). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (p= 0.95). 70

Figura 10. Média (e DP) dos valores do conteúdo de proteína total (n= 4). Comparação entre os grupos: diferença não significativa aos 7 (p= 0.06), 14 (p= 0.06) e 21 dias (p= 0.06).

Diferentes períodos: diferença estatisticamente significativa em função do tempo no grupo L (p= 0.01). *7 dias=14 dias>21 dias. 71

Figura 11. Média (e DP) da atividade de fosfatase alcalina (n= 4). Comparação entre os grupos: não foram encontradas diferenças significativas aos 7 (p= 0.36), 14 (p= 0.29) e 21 dias (p= 0.24). Diferentes períodos: diferença estatisticamente significativa em função do tempo em todos os grupos (p< 0.001). 7 dias<14 dias>21 dias. 72

Figura 12. Aspectos micrográficos dos osteoblastos derivados de osso alveolar humano e da matriz calcificada sobre as superfícies de Ti estudadas. Superfícies: L (A), L1 (B), J (C), J1 (D) e J2 (E). Aumento original: 1000 X, modo SE. 73

Figura 13. Espectros de EDS das superfícies estudadas aos 21 dias de cultura. Superfícies: L, L1, J, J1 e J2 (A, B, C, D e E, respectivamente). Notar que em todas as superfícies pode-se verificar a presença de Ca e P. Notar também a presença do Al na superfície J (em C). 74

Figura 14. Aspectos micrográficos das superfícies J e J2. Em A e B, imagens iniciais das superfícies com nódulos corados por vermelho de alizarina. Em C e D, identificação das regiões. Em E e F, inversão dos tons (claro/escuro - binarização); imagens prontas para quantificação. Aumento original: 40 X. 76

LISTA DE QUADROS

Quadro I: Superfícies e condições empregadas no ataque químico das amostras de titânio. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média (\pm DP), em μm , da rugosidade (Ra) das diferentes superfícies.	62
Tabela 2. Média (\pm DP) dos valores da área, diâmetro das partículas e número de regiões ocupadas pela alumina nas diferentes superfícies	66
Tabela 3. Área média (\pm DP) ocupada pela matriz calcificada nas diferentes superfícies.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

Al: alumínio

Al₂O₃: óxido de alumínio (ou alumina)

ALP: fosfatase alcalina

atm: atmosfera

Au: ouro

BSE: elétrons retroespalhados, do inglês “back-scattered elétrons”

BSP II: sialoproteína óssea, do inglês “bone sialoprotein”

Ca: cálcio

Cbfa1: fator de transcrição osteoblástico, do inglês “core-binding factor” alfa 1

CM: células mortas

CT: número total de células

CVA: número de células viáveis

EDS: espectroscopia por dispersão de energia

EDTA: ácido etileno diaminotetraacético

ELISA: teste imunoenzimático, do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”

Fe: ferro

FN: fibronectina

g: grama

HA: hidroxiapatita

HCl: ácido clorídrico

HF: ácido fluorídrico

HNO₃: ácido nítrico

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: ácido sulfúrico

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina - 1

Il-1: interleucina – 1

Il-6: interleucina – 6

ITI: do inglês “International Team for Oral Implantology”

kPa: quilopascal

MBC: contato osso-implante, do inglês “metal-bone contact”

MC3T3-E1: linhagem comercial de osteoblastos de calvária de camundongo

α-MEM: Meio Mínimo Essencial

MEV: microscópio eletrônico de varredura

MG63: linhagem comercial de osteoblastos humanos (osteosarcoma)

MS: superfície usinada, do inglês “machined surface”

μg: micrograma

μm: micrômetro

ml: mililitro

MTS: Meio Total Suplementado

P: fósforo

PA: pró-análise

PBS: solução salina, do inglês “phosphate buffered saline”

PCR: reação em cadeia de polimerase, do inglês “Polymerase chain reaction”

PGE2: prostaglandina E2

PMMA: polimetilmetacrilato

PTFE-e: politetrafluoretileno-expandido

PTH: hormônio da paratireóide

Ra: rugosidade média, do inglês “roughness average”

ROG: regeneração óssea guiada

S: potássio

s: segundo

SaOS-2: linhagem comercial de osteoblastos

SE: do inglês “secondary electrons”

SLA: do inglês “sand-blasted and acid-etched”

TGF- β 1: fator de crescimento de transformação - beta 1, do inglês “transforming growth factor beta 1”.

Ti – 6Al-4V: liga de titânio – alumínio - vanádio

Ti cp: titânio comercialmente puro

TIF (ou TIFF): formato de imagens

TNF: fator de necrose tumoral, do inglês “tumor necrosis factor”

TPS: do inglês “Titanium Plasma Spray”

V: vanádio

1. INTRODUÇÃO

A reposição de dentes perdidos tem sido um grande desafio para o homem ao longo da história. A implantação de substitutos artificiais por muito tempo foi vista como uma opção pouco previsível, por empregar técnicas e materiais de maneira empírica²⁸. Uma nova modalidade terapêutica começou a tomar corpo na década de 1950, com o desenvolvimento inicial dos implantes endósseos (de BRANEMARK). Estudos clínicos realizados posteriormente mostraram que este tipo de implante apresenta uma alta previsibilidade⁸¹.

A chave para o sucesso da terapia com implantes endósseos é a integração tecidual, ou osseointegração, fenômeno que foi definido como “a união estrutural e funcional direta entre o osso vital e organizado e a superfície de um implante dentário submetido a cargas funcionais”². Trata-se, portanto, de um processo dinâmico de interação osso-implante que resulta em ancoragem óssea direta e estabilidade do biomaterial⁸¹. A utilização de implantes osseointegráveis tem proporcionado índices elevados de sucesso clínico^{1, 5}, que podem chegar a 97-98%, após 5 anos^{15, 60}. Graças a estes resultados, esta modalidade de tratamento é aceita amplamente e está consolidada como um recurso importante na reabilitação bucal²⁸.

A osseointegração é um processo influenciado por vários fatores, entre eles o material do implante, seu desenho e a topografia superficial do mesmo⁸¹. Muitos materiais têm sido testados na composição de implantes dentários, porém poucos possuem uma biocompatibilidade aceitável⁷. O titânio (Ti) e suas ligas, por suas qualidades, têm sido os materiais de escolha dos implantes disponíveis atualmente²⁸. O sucesso destes materiais tem sido atribuído principalmente a biocompatibilidade da camada de óxido superficial⁶⁶. Além disso, o Ti é um metal leve, resistente à corrosão e ao ataque químico. Pode ser facilmente manipulado, sem interferência na sua elasticidade e resistência mecânica⁸¹.

Quando um implante é instalado cirurgicamente, uma série de reações acontecem na sua superfície. O implante é exposto a diferentes íons, polissacarídeos, proteínas e células como fibroblastos, condrócitos e osteoblastos. A resposta celular depende das características superficiais do implante⁵ e de suas propriedades químicas¹⁴. A cultura de células possibilita o estudo da citotoxicidade, da adesão, proliferação e diferenciação celular e, nesse sentido, fornece informações inigualáveis para o melhor entendimento do fenômeno da osseointegração²¹. As principais vantagens na utilização das culturas de células são: o controle físico-químico do ambiente de crescimento celular e a manutenção constante das condições fisiológicas na cultura³¹.

Células originárias de calvária de ratos, de medula óssea e de linhagens têm sido usadas com frequência no estudo da biocompatibilidade de vários materiais empregados em implantodontia. Porém, células obtidas de animais nem sempre podem substituir aquelas oriundas de tecidos humanos e, portanto, apresentam uma limitação⁵⁴. Além disso, linhagens ou células isoladas de sítios não associados com a cavidade bucal podem também não ser adequadas para o estudo dos eventos relacionados com a osseointegração de implantes dentários⁴¹. Por isso, o isolamento e a cultura primária de células ósseas derivadas de tecido ósseo intrabucal são fundamentais no estudo dos eventos biológicos envolvendo biomateriais com aplicação na implantodontia, por apresentarem características que representam com maior fidelidade às condições clínicas presentes na boca⁵⁴.

Diversos trabalhos têm documentado os efeitos biológicos de diferentes superfícies de implante, usando a cultura de células. A rugosidade superficial favoreceu, “in vitro”, a adesão e proliferação de osteoblastos^{4, 43, 62}, sua diferenciação e a produção de matriz extracelular^{12, 24, 58, 67, 73} e a expressão de genes que regulam sua diferenciação⁷⁷. Estes resultados têm sido confirmados por estudos “in vivo” que têm mostrado um maior contato osso-implante com o uso de implantes com superfícies rugosas^{19, 20, 49}.

Vários tratamentos têm sido propostos para alterar a superfície do titânio². As técnicas que utilizam plasma “spray” de titânio (TPS, do inglês “Titanium Plasma Spray”) e hidroxiapatita (HA) modificam a superfície do titânio por um processo aditivo, enquanto as técnicas que usam ácido ou o jateamento são processos subtrativos²⁴. Porém, a contaminação após o processo de jateamento com Al₂O₃ (alumina) pode chegar a quase 10% da composição química superficial²⁴. Segundo PULEO e NANCI⁶⁸, mesmo que traços de metais sejam considerados essenciais para a saúde, também podem ser tóxicos e causar reações inflamatórias. Vários trabalhos falharam em mostrar diferenças significativas no comportamento celular sobre superfícies de titânio com e sem resíduos, incluindo o alumínio (Al). Ainda que DARVELL et al.²³ tenham recomendado que o jateamento com alumina fosse evitado, como uma medida de precaução, a importância biológica da presença deste contaminante inorgânico permanece conjectural²⁹. Dessa forma, o objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos de amostras de Ti, com diferentes rugosidades superficiais e quantidades variadas de alumina, na adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos derivados de osso alveolar humano, e na formação da matriz mineralizada.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Osteoblastos e a formação do tecido ósseo

O osso contém dois tipos de células distintas: os osteoblastos e os osteoclastos. Esse tecido é constantemente reabsorvido pelos osteoclastos e reformado pelos osteoblastos, em um processo fisiológico chamado remodelação óssea. Segundo DUCY, SCHINKE e KARSENTY²⁷ em cultura celular é praticamente impossível distinguir um osteoblasto de um fibroblasto. A única característica específica dos osteoblastos localiza-se externamente às células: uma matriz extracelular mineralizada.

Após a síntese e liberação de moléculas orgânicas pelos osteoblastos, uma camada rica em colágeno, chamada osteóide, é formada, e funciona como um arcabouço para a deposição da apatita mineral e para o acúmulo de proteoglicanas e proteínas não-colágenas. Para SODEK e McKEE⁷⁹, a formação de uma matriz mineralizada é o último estágio de um processo que se inicia com a quimiotaxia e proliferação de células mesenquimais. Este processo é idêntico para fibroblastos, cementoblastos e odontoblastos. A diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos provavelmente é fruto da expressão de um gene chave no processo de osteopoiese (cbfa1, do inglês “core-binding factor alfa 1).

A osteogênese, característica principal do osteoblasto, refere-se à sua capacidade de produzir uma matriz mineralizada. No processo de desenvolvimento celular, as células, que inicialmente são multipotentes, ou seja, com capacidade para gerar vários tecidos, vão perdendo esta característica ao longo do tempo, resultando em uma célula madura e unipotente, o osteoblasto. Dentre as suas funções principais, os osteoblastos regulam os níveis de cálcio (Ca) e fósforo (P) e a atividade dos osteoclastos⁵².

2.2 Comportamento celular em diferentes superfícies de titânio

É sabido que o comportamento das células pode variar de acordo com o material e a superfície que compõem os implantes dentários. De acordo com BRUNETTE¹⁴, a integração de um implante dentário é um fenômeno complexo, pois existem três tipos distintos de tecidos envolvidos: epitélio, tecido conjuntivo e osso. Além disso, quatro fatores parecem determinar o sucesso do implante: o sítio receptor, o trauma dos tecidos, as propriedades do implante e a capacidade de absorção das cargas mastigatórias. Uma superfície com determinadas características poderia ajudar na osseointegração por ter o potencial de atrair, seletivamente, certas populações celulares e alterar suas funções. Por isso, o autor incentiva mais estudos na área de engenharia de materiais, principalmente enfatizando os seguintes pontos: contato inicial célula-implante, adesão celular seletiva, com a participação de glicoproteínas adesivas, material utilizado na confecção do implante, rugosidade superficial e energia de superfície, pois, para o autor, a interação entre as células e os implantes dentários seria ditada por uma combinação de fatores mecânicos, químicos e físicos. Portanto, o estudo destas variáveis pode ser fundamental para o desenvolvimento das características dos implantes dentários no futuro.

BOWERS et al.¹², em 1992, estudaram a resposta celular, “in vitro”, de osteoblastos de calvária de ratos a diferentes superfícies. Um rugosímetro foi usado para determinar as diferentes morfologias superficiais. Os espécimes foram tratados com lixas metalográficas, jateados com alumina ou tratados quimicamente com ácido fluorídrico/ácido nítrico (HF/HNO₃) Os períodos estudados para a adesão foram de 15, 30, 60 e 120 minutos. As células, na quantidade inicial de 10⁵ unidades/ml, aderiram em maior número, de maneira significativa, nas superfícies rugosas produzidas pelo jateamento.

STANFORD, KELLER e SOLURSH⁸⁰ avaliaram as respostas fenotípicas de osteoblastos derivados de calvária de ratos, cultivados na densidade de 5100 células/cm², em

superfícies de Ti cp (Titânio comercialmente puro). As superfícies receberam três tratamentos mecânicos diferentes para modificar a rugosidade: superfície lixada, jateada com alumina (granulometria de 50 μm - micrômetros) ou polida com pasta de diamante de 1 μm . Posteriormente, as amostras foram esterilizadas de quatro formas diferentes (luz ultravioleta, autoclave, gás de óxido etileno e limpeza em câmara de plasma, onde uma descarga elétrica era usada para criar um campo energético que fisicamente bombardeava a superfície do implante). A atividade de fosfatase alcalina (ALP) e produção de osteocalcina foram bastante afetadas pela rugosidade superficial quando as superfícies eram tratadas pelo plasma. Os níveis de proteínas específicas de osso, osteocalcina e ALP eram mais altos nas superfícies polidas e mais baixos nas superfícies rugosas tratadas pelo plasma. Portanto, a expressão da célula óssea pode ser alterada por tratamentos mecânicos superficiais e o tipo de esterilização empregada.

KASPERK et al.⁴¹ verificaram que o fenótipo da célula óssea humana depende da sua origem no esqueleto. Os autores observaram uma maior proliferação nos osteoblastos derivados de mandíbula do que nos osteoblastos de crista ilíaca, porém uma menor produção de ALP. Além disso, a expressão de fatores de crescimento apresentou-se distinta entre as células ósseas de origens diferentes.

Estudar o efeito da rugosidade superficial sobre a proliferação, diferenciação e síntese protéica de osteoblastos humanos foi o objetivo de MARTIN et al.⁵⁸. Os autores cultivaram células de linhagem osteoblástica humana (MG 63), originalmente isoladas de osteosarcoma, na densidade de 9300 células/cm², sobre discos de titânio preparados com cinco tipos diferentes de tratamento mecânico. Todas as superfícies recebiam um tratamento prévio com HNO₃ e HF. Um grupo não recebeu tratamento adicional algum. Os quatro grupos restantes foram formados, aumentando progressivamente de rugosidade, com as seguintes características: superfície eletropolida, jateada com pedra fina e tratada com ácido clorídrico

(HCl) e ácido sulfúrico (H₂SO₄), jateada com areia e tratada quimicamente da mesma forma que a anterior, e jateada com pó de titânio (TPS). Poços de cultura sem material algum foram usados como controle. O efeito da rugosidade do titânio sobre as células foi medido pela contagem celular, atividade de ALP, além de estudo específico de matriz extracelular. Os resultados demonstraram que a rugosidade superficial altera a proliferação, diferenciação e produção de matriz extracelular “in vitro”. O número de células era menor na superfície TPS; as outras superfícies se assemelhavam a controle. A atividade de ALP decrescia com o aumento da rugosidade. Estes resultados também sugerem que a superfície rugosa dos implantes pode determinar diferentes expressões fenotípicas dos osteoblastos “in vivo”.

Para BOYAN et al.¹³, durante o período de cicatrização as primeiras células a interagirem com a superfície do material não estão diferenciadas. São, na sua maioria, células mesenquimais. Elas poderão ser levadas a se diferenciar em osteoblasto, devido às influências da micromorfologia da superfície do implante. Portanto a rugosidade superficial do titânio parece afetar a diferenciação celular, possibilitando a produção de matriz extracelular.

A rugosidade superficial do titânio tem efeito na proliferação, diferenciação e produção de matriz extracelular de osteoblastos, segundo KIESWETTER et al.⁴⁵. As citocinas e os fatores de crescimento presentes nos tecidos em torno de implantes podem ser influenciados pela superfície dos mesmos. Caso isso seja verdade, estas substâncias teriam o potencial de modular o processo de cicatrização. Para testar esta hipótese, os autores examinaram o efeito da rugosidade superficial na produção de duas substâncias com reconhecido efeito sobre o osso: prostaglandina E2 (PGE2) e fator de crescimento de transformação beta 1 (TGF-beta 1, do inglês “transforming growth factor beta 1). As células (MG 63) foram cultivadas em discos de titânio com várias rugosidades. Os níveis de PGE2 e TGF-beta 1 foram determinados por radioimunoensaios e ELISA, respectivamente. A produção de PGE2 foi maior (de 1, 5 a 4 vezes) nas superfícies rugosas. A produção de TGF

beta 1 foi ainda maior (3 a 5 vezes) nas mesmas superfícies. Estes resultados sugerem que a rugosidade superficial modula a atividade das células de maneira positiva.

Os efeitos da rugosidade superficial do titânio na proliferação, produção de matriz extracelular e diferenciação de condrócitos em diferentes estágios de maturação foram estudados por SCHWARTZ et al.⁷⁸. As células, derivadas de duas zonas distintas da cartilagem costochondral de ratos, eram cultivadas em quantidades de 25000 ou 10000 (dependendo da zona da cartilagem) células/cm², em discos de titânio com diferentes rugosidades. Todas as superfícies recebiam um tratamento prévio com ácido nítrico e ácido hidrofúorídrico. Um grupo não recebeu nenhum tratamento adicional. Os quatro grupos restantes foram formados, aumentando progressivamente de rugosidade, com as seguintes características: superfícies eletropolidas, jateada com pedra fina e tratada com HCl e H₂SO₄, jateada com areia e tratada quimicamente da mesma forma que a anterior e jateada com pó de titânio (TPS). Poços de cultura sem material algum foram usados como controle. A proliferação celular foi estabelecida pela contagem das células e a diferenciação pela atividade de ALP. Outros testes específicos foram realizados para medir a produção de matriz extracelular. Os achados foram variados de acordo com a maturação celular e rugosidade superficial. A proliferação celular (número de células na superfície) reduzia com o aumento da rugosidade superficial, independente do grau de maturação celular. Já a atividade de ALP pareceu mais dependente do grau de maturação dos condrócitos. Porém, na superfície mais rugosa (TPS) as células apresentaram menor atividade de fosfatase alcalina, o que pode indicar um menor grau de diferenciação. Os resultados mostraram que a rugosidade superficial afeta a proliferação, diferenciação e produção de matriz pelos condrócitos variando de acordo com a maturação celular.

COOPER et al.²¹ publicaram uma revisão de literatura sobre os fenômenos que ocorrem na osseointegração e a importância dos estudos “in vitro” que podem ajudar a

entender estes fenômenos. Segundo os autores, o uso de cultura celular para estudar o comportamento dos osteoblastos durante o processo de osseointegração tem sido de grande valia. A interação dos osteoblastos com diferentes substratos pode ser estudada pela citotoxicidade, adesão, proliferação e diferenciação celular. A produção de uma matriz extracelular pelos osteoblastos cultivados em superfícies de implante pode ser interessante para desvendar a interface osso-material. Portanto, a cultura celular pode fornecer informações em nível molecular e celular que podem trazer melhorias no desenho de implantes e nos materiais usados em implantodontia.

Em uma revisão, publicada em 1998, ELLINGSEN²⁸ descreveu varias características de materiais e superfícies usados em implantodontia. Porém, segundo ele, o titânio e suas ligas seriam os materiais de escolha, por terem a melhor biocompatibilidade. Com relação às superfícies, as rugosas são as que resultam em melhor osseointegração, porém uma rugosidade ideal deve estar presente. Segundo o autor, as irregularidades superficiais devem ter 100 µm de dimensão, no mínimo. Esta microtopografia ótima pode ser criada com jateamento com partículas de 25 a 75 µm.

LINCKS et al.⁵⁰ determinaram o efeito da composição química e da rugosidade superficial do Ti cp e de uma liga de titânio (Ti – 6Al-4V) sobre osteoblastos MG63. Discos de Ti (cp e liga) foram polidos ou jateados com óxido de alumínio/óxido de zircônio, resultando em 2 grupos de superfícies: lisas e rugosas. As células, na densidade de 9.300 por poço, eram cultivadas sobre os cilindros. Foram determinadas, após 24 horas da confluência, a morfologia celular em MEV (microscópio eletrônico de varredura), a proliferação, pela incorporação da timidina, a diferenciação celular pela atividade de ALP e produção de osteocalcina, e a produção de matriz. Os resultados mostraram que os parâmetros estudados foram influenciados pela composição química e rugosidade superficial. Os melhores resultados foram encontrados com a utilização de Ti cp com uma microtopografia rugosa.

ANSELME et al.³ estudaram a influência da topografia e da composição química do titânio no comportamento de osteoblastos. Para isso, os autores utilizaram amostras de liga de titânio (Ti-6Al-4V) com diferentes rugosidades. Com o jateamento com alumina, os autores observaram a presença marcante desta substância como contaminante. Os melhores resultados, na adesão e proliferação de osteoblastos humanos de crista ilíaca e de linhagem (MC3T3-E1) foram encontrados nas superfícies lisas. Nas superfícies mais rugosas, jateadas com alumina, os piores resultados encontrados podem indicar um possível efeito citotóxico do alumínio.

ORSINI et al.⁶⁴ analisaram superfícies de Ti usinadas, jateadas e tratadas com ácidos (HF/HNO₃). Posteriormente, estudaram a citotoxicidade destas superfícies utilizando linhagem de fibroblastos (L929) e osteoblastos (MG63). Os resultados mostraram que as células apresentavam-se morfológicamente mais irregulares e continham muitos prolongamentos citoplasmáticos sobre as superfícies jateadas e tratadas com ácidos. Segundo os autores, estas características, não verificadas nas superfícies lisas, podem ser a explicação para a maior ancoragem inicial observada na superfície rugosa.

SYKARAS et al.⁸¹ promoveram uma revisão de literatura com o objetivo de descrever a composição, os desenhos e as topografias superficiais dos implantes dentários. A revisão incluiu uma discussão dos princípios biológicos da osseointegração e como o processo de interação osso-implante pode ser influenciado por diferentes materiais, desenhos e características superficiais.

ARAÚJO et al.⁴ analisaram a adesão e proliferação de osteoblastos derivados de calvária de ratos. As células (10⁶ por ml) foram cultivadas por 1, 2 e 3 dias em implantes dentários, no seu recipiente original, com 2 superfícies distintas, uma jateada (Ankylos), e a outra SLA (Straumann). As análises foram feitas em MEV. Não foram encontradas diferenças significativas na adesão celular. Porém, as células proliferaram mais rapidamente nos

implantes jateados (Ankylos). Este fenômeno talvez seja explicado, segundo os autores, pela maior rugosidade superficial.

DINIZ²⁴, em 2001, estudou a influência de tratamentos superficiais sobre chapas de titânio na osteogênese em culturas de células com origem na medula humana. Amostras de titânio com diferentes rugosidades foram preparadas combinando tratamentos mecânicos, com lixas metalográficas e jateamentos abrasivos com alumina, e químicos (H_2SO_4/HCl ou HF). Os osteoblastos (2×10^4) foram cultivados nas diferentes superfícies. A adesão celular foi semelhante nos diferentes grupos. As células também tiveram uma proliferação satisfatória nas superfícies variadas. A atividade de fosfatase alcalina foi maior nas células cultivadas sobre as superfícies tratadas com solução a base de HF. Somente os materiais submetidos aos jateamentos abrasivos e aos ataques com soluções ácidas levaram as culturas até a mineralização da matriz extracelular.

LAUER et al.⁴⁷ estudaram os efeitos da textura superficial na adesão e proliferação de queratinócitos e osteoblastos humanos de maxila. Os autores verificaram que os queratinócitos foram mais influenciados pelas variações na superfície. Estas células encontravam-se espalhadas nas superfícies polidas, enquanto nas superfícies rugosas apresentavam uma forma mais cubóide. Já os osteoblastos aderiram bem nas diferentes superfícies, mostrando um padrão bastante semelhante, independente da rugosidade superficial.

Segundo DINIZ et al.²⁶, o melhor comportamento das células de medula óssea humana sobre superfícies jateadas com alumina e tratadas com ácido, medido principalmente pela produção de matriz calcificada, talvez possa ser explicado pela microtopografia mais homogênea da superfície resultante destes tratamentos. Além disso, os autores verificaram que o HF foi mais efetivo que o H_2SO_4 em regularizar a superfície de Ti, e em remover a alumina contaminante.

MUSTAFA et al.⁶² avaliaram os efeitos de superfícies de titânio com diferentes rugosidades na adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos humanos. Os autores utilizaram óxido de titânio com granulometrias variando de 60 a 300 µm para alterar a topografia superficial das amostras. Após 3 horas de cultivo, eles encontraram diferenças significativas com relação à proliferação e produção de osteocalcina entre as superfícies rugosas e lisas. A superfície que apresentou melhores resultados foi a jateada com partículas variando de 106 a 180 µm. O aumento da rugosidade proveniente de jateamento com partículas acima deste valor não melhorou a performance das superfícies.

KELLER et al.⁴³ estudaram a adesão de osteoblastos em superfícies de titânio com rugosidades variadas. Amostras de Ti cp foram preparadas por polimento com lixa, jateamento ou jateamento seguido de ataque ácido. A adesão dos osteoblastos (MC3T3-E1) esteve diretamente relacionada à rugosidade superficial, pois os maiores níveis de adesão foram encontrados nas superfícies mais rugosas.

POSTIGLIONE et al.⁶⁷ investigaram os efeitos de 3 diferentes superfícies de titânio: lisa, jateada e TPS na proliferação, diferenciação e apoptose de uma linhagem osteoblástica humana (SaOS-2). A proliferação celular foi maior na superfície lisa, porém a síntese de proteínas da matriz extracelular, a expressão de receptores de integrina e a atividade de fosfatase alcalina foram superiores nas superfícies rugosas. Não foram encontradas diferenças em relação a apoptose. Os resultados indicaram que a topografia superficial afeta a proliferação e a diferenciação destas células, sugerindo que as propriedades superficiais devem ser importantes para resposta do tecido ósseo ao redor de implantes “in vivo”.

ROSA e BELOTI⁷³ também estudaram o comportamento de osteoblastos em superfícies de titânio com rugosidades variadas. A adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos humanos de medula óssea foram verificadas após 4 horas, 21 e 28 dias. A adesão não foi afetada pela rugosidade. A proliferação foi menor em superfícies com rugosidade (Ra)

variando de 0,80 a 1,90 μm , enquanto a atividade de ALP e quantidade de proteína total foram superiores nesta faixa de rugosidade. Os resultados sugerem que superfícies de titânio variando de 0,80 a 1,90 μm de rugosidade (Ra) parecem otimizar as respostas celulares intermediárias e finais.

Segundo SCHNEIDER et al.⁷⁷, o fator de transcrição Cbfa1 regula a diferenciação dos osteoblastos e a expressão de genes necessários para o desenvolvimento de um fenótipo mineralizado. Para determinar se a expressão deste fator era influenciada pela microtopografia, osteoblastos foram cultivados em superfícies lixadas ou jateadas. A mineralização foi avaliada pela coloração vermelho-alizarina. O PCR (reação em cadeia de polimerase, do inglês “Polymerase chain reaction”) foi usado para quantificar a expressão genética de Cbfa1 e BSP11 (sialoproteína óssea, do inglês “bone sialoprotein”). A mineralização e a expressão do Cbfa1 e de BSP11 em geral foram mais significativas nas superfícies rugosas. Portanto, a expressão genética dos osteoblastos parece ser afetada pela rugosidade superficial.

XAVIER et al.⁸⁷ investigaram a biocompatibilidade do Ti cp, submetido a diferentes tratamentos superficiais. Usando células de medula óssea de ratos, cultivadas sobre as diferentes superfícies, os autores avaliaram a adesão, proliferação, conteúdo de proteína total, atividade de ALP e formação de nódulos calcificados. Os resultados mostraram que a adesão, proliferação e atividade de ALP não foram afetadas pelas superfícies com graus variados de rugosidade. O conteúdo total de proteínas e a formação de nódulos ósseos apresentaram-se significativamente reduzidos nas superfícies jateadas e atacadas com ácido. Portanto, este trabalho sugere que as superfícies lisas de Ti cp parecem favorecer a diferenciação dos osteoblastos derivados da medula óssea de ratos.

BACHLE e KOHAL⁶ promoveram, em 2004, uma revisão sistemática da influência de diferentes superfícies de titânio na proliferação, diferenciação e síntese proteica sobre uma

linhagem de osteoblastos (MG-63). Um total de 348 referências foi avaliado. Nove trabalhos foram considerados relevantes, de acordo com o objetivo do estudo. Segundo os autores, parece não existir diferenças no comportamento celular frente a superfícies distintas, provavelmente devido a enorme variação nas condições de cultura e nas topografias superficiais avaliadas nos diferentes trabalhos.

ROSA e BELOTI⁷⁵ mostraram que a utilização de osteoblastos humanos derivados de medula óssea, após várias subculturas, afetava negativamente a diferenciação destas células, com redução da atividade de ALP e da formação de nódulos calcificados.

2.3 Superfícies de Implantes: estudos “in vivo”

ADELL et al.¹ estudaram, por um período de 15 anos, 2768 implantes rosqueados, instalados em 371 pacientes edêntulos. Durante a cicatrização e no primeiro ano, a perda óssea observada foi de 1.5 mm. Entretanto, após estes períodos, apenas 0.1 mm foi perdido anualmente. Na maxila e na mandíbula, as próteses se mantiveram estáveis, no período, em 81 e 91% dos casos, respectivamente.

Segundo BABBUSH⁵, os pacientes com mandíbulas edêntulas totais são o grupo mais difícil e complicado para restaurar a função. A utilização de implante rosqueado, com superfície TPS, é uma solução previsível e de custo reduzido para este grupo de pessoas, pois apresentou um grau de sucesso de 94%, em 484 pacientes de quatro países diferentes, com 1739 implantes deste tipo.

BUSER et al.¹⁵ avaliaram a integração de implantes ITI (do inglês “International Team for Oral Implantology”), de um estágio (não submersos), por um período de 1 ano. 100 implantes foram colocados em 70 pacientes idosos parcialmente edentados. Baseados em

critérios clínicos e radiográficos, os autores encontraram “sucesso” em 98 implantes. Um implante falhou e outro requereu tratamento local e sistêmico para infecção.

GOTFREDSSEN et al.³³ compararam a ancoragem de implantes, cilíndricos ou com rosca, jateados com TiO₂ (óxido de titânio) versus (vs) implantes com ambos os desenhos, porém usinados. Após a extração de pré-molares, 24 implantes foram colocados em 6 cães, 6 de cada desenho e superfície. Passadas 12 semanas, 16 implantes foram usados para estudo do torque de remoção. Os implantes jateados apresentaram resultados superiores aos usinados, sendo que os implantes com rosca e jateados apresentaram os melhores resultados que os implantes jateados cilíndricos. Nos outros implantes, os autores estudaram histomorfometricamente o percentual de contato osso-implante. Observou-se que não foi encontrada diferença entre as duas superfícies.

MERICSKE-STERN et al.⁶⁰ estudaram longitudinalmente, por 5 anos, aspectos relacionados a implantes ITI, suportando sobre-dentaduras. Foram instalados 66 implantes em 33 pacientes idosos edentados totais. Durante o período de estudo, dois implantes falharam e foram removidos. No final do período, radiografias mostraram defeitos ósseos em 16 implantes (22%) de 12 pacientes. Este estudo mostrou que pessoas idosas não apresentam alto risco de desenvolver lesões peri-implantares com o uso deste tipo de implante.

Em 1996, COCHRAN et al.¹⁹ compararam a performance “in vivo” de duas superfícies de implante de titânio distintas, SLA e TPS. Sessenta e nove implantes foram colocados em 6 cães. Em períodos que variaram de três meses, sem carga mastigatória, a 12 meses, com carga mastigatória, foram feitas radiografias padronizadas. Dois parâmetros foram estudados: a medida entre a parte mais coronal do implante (ombro) e o ponto mais coronal de contato osso-implante, e uma avaliação da densidade óssea. Os resultados mostraram, em quase todos os parâmetros e períodos, uma superioridade da superfície SLA sobre a TPS, com e sem carga mastigatória.

LARSSON et al.⁴⁶ estudaram a resposta tecidual a implantes de titânio com diferentes superfícies. Após o preparo dos implantes, que gerou superfícies usinadas e eletropolidas (EP), os autores promoveram a inserção dos implantes no osso cortical de coelhos. Após 1, 3 e 6 semanas, os implantes foram removidos. Os resultados mostraram que os implantes com superfícies EP apresentaram menor contato osso-implante que as superfícies usinadas. Segundo os autores, as superfícies EP, com rugosidade superficial reduzida, diminuem inicialmente o grau de formação óssea.

Também em 1996, WENNERBERG, ALBREKTSSON e LAUSMAA⁸⁵ promoveram uma comparação entre implantes jateados com partículas de alumina de 25 ou 75 μm . A caracterização das duas superfícies mostrou rugosidades distintas, porém composição química semelhante. Após 12 meses da inserção dos implantes em fêmur e tíbia coelhos, os autores encontraram melhores resultados, com relação à torque de remoção e contato osso-metal, nos implantes jateados com partículas de 75 μm .

COCHRAN et al.²⁰ compararam novamente a performance “in vivo” de duas superfícies de implante de Ti distintas, SLA e TPS. Sessenta e nove implantes foram colocados em 6 cães. Em períodos que variaram de três meses sem carga mastigatória até 12 meses, com carga mastigatória, foram feitas análises histométricas. Foi utilizado como parâmetro a porcentagem de contato osso-metal (MBC, do inglês “metal-bone contact”). Novamente os resultados mostraram, em quase todos os parâmetros e períodos, uma superioridade da superfície SLA, com e sem carga mastigatória. A vantagem foi maior nos períodos iniciais, o que pode indicar uma promoção precoce de osseointegração. Este fato poderia transformar a superfície SLA, segundo os autores, em uma boa candidata para carga imediata.

HAN et al.³⁵ promoveram um estudo “in vivo” para avaliar implantes de Ti e de liga de Ti (Ti-6Al-4V). Após jatear os implantes com TiO_2 com diferentes tamanhos, os autores

instalaram-nos em coelhos. Aos 3 meses, os implantes foram removidos. Análises quantitativas e qualitativas mostraram, através do cálculo do MBC, que a liga de Ti apresentava menor formação óssea que o Ti cp.

JOHANSSON et al.³⁹ promoveram uma comparação quantitativa entre implantes usinados de Ti cp e de liga de Ti (Ti-6Al-4V) instalados em tíbia de coelhos. Após 6 e 12 meses da implantação, observou-se que os implantes de Ti cp apresentavam maior estabilidade que os de liga, pois necessitavam de um torque significativamente maior para sua remoção. Além disso, houve uma tendência de maior MBC nos implantes Ti cp.

O objetivo do estudo de LIMA⁴⁹ foi avaliar a resposta tecidual, o padrão de reparação dos tecidos periimplantares e a influência das características das superfícies de Ti na osseointegração, após a colocação do implante simultaneamente a regeneração óssea guiada (ROG). Quatro meses após a extração de todos os pré-molares de 5 cães, defeitos foram produzidos nas regiões (7x7x7 mm) e foram instalados os 30 implantes (SLA, TPS ou usinado - MS), simultaneamente a ROG (membranas de PTFE-e - politetrafluoretileno-expandido). Os animais foram sacrificados após 16 e 24 semanas. O processamento histológico foi realizado sem descalcificação. As análises descritivas e histométricas mostraram que as superfícies SLA e TPS influenciaram positivamente a osseointegração, quando comparadas a MS, tanto para osso regenerado como para osso pré-existente.

2.4 Influência de partículas residuais sobre células e tecidos ósseos

Para estudar os efeitos iniciais do Al sobre o osso, GOODMAN³² forneceu este elemento (2 mg) em intervalos variados e observou o crescimento de osso cortical de ratos. O Al, ou uma solução salina, foi administrado nos animais. Durante a exposição ao metal, a formação de matriz e de osso foi reduzida. Também foi encontrada uma menor espessura do

tecido osteóide em relação ao controle. Portanto, o Al promoveu uma redução da formação óssea pela supressão da síntese de matriz.

IKEDA et al.³⁷ estudaram a inibição da mineralização pela adição de Al em meio de cultura. Os autores utilizaram linhagem de osteoblastos (MC3T3-E1). A proliferação celular e a produção de fosfatase alcalina não foram afetadas pelo Al. Porém, a quantidade de Ca na matriz reduzia de maneira dose dependente, com a adição progressiva de Al.

Em 1989, RODRIGUEZ, FELSENFELD e LIACH⁷¹ estudaram se a causa da osteomalacia, que se caracteriza pelo acúmulo de osteóide e diminuição da mineralização, estava relacionada com a toxicidade do Al. Ratos com deficiência renal receberam 20 mg de alumínio, via intra-peritoneal, durante 2 dias. Os autores buscaram verificar, por observações seqüenciais, o desenvolvimento da osteomalacia. Os animais foram sacrificados em períodos de 5 a 40 dias, após a administração do Al. Após 12 dias, o Al promoveu um aumento no volume do osteóide, o que acarretou em uma menor formação óssea. Portanto, altos níveis de alumínio no plasma podem ser tóxicos aos osteoblastos.

Em 1990, JOSSET et al.⁴⁰ estudaram as reações de osteoblastos humanos em cultura contendo zircônio e alumina. O estudo da citotoxicidade, com sulfato de metiltiazole, revelou que nenhum dos materiais afetou negativamente as células. Além disso, a proliferação celular e a síntese de proteína total foram semelhantes ao controle. A imunohistoquímica mostrou que as células eram capazes de produzir colágeno, osteonectina, osteocalcina e fibronectina.

No mesmo ano, RODRIGUEZ, FELSENFELD e LIACH⁷² novamente estudaram o assunto. Desta vez, o hormônio PTH foi administrado em ratos que apresentavam osteomalacia induzida pelo Al para verificar se o efeito deste elemento na diminuição da mineralização estaria relacionado com a diminuição do número de osteoblastos. Quatro grupos de animais foram estudados: com deficiência renal (controle), com deficiência renal mais Al, com deficiência renal mais PTH (hormônio da paratireóide) e com deficiência renal

mais Al e PTH. Os ratos foram sacrificados após 5 e 12 dias. A administração de Al diminuiu o número de osteoblastos, aumentou o acúmulo de osteóide e paralisou a formação óssea. A infusão de PTH aumentou o número das células e a da formação óssea. A administração simultânea de ambos resultou em um número intermediário de osteoblastos, embora não tenha aumentado a formação óssea. Estes achados, segundo os autores, indicam que o Al é tóxico aos osteoblastos e também inibem a formação óssea, mesmo quando o número destas células encontra-se relativamente elevado.

LEWANDOWSKA-SZUMIEL e KOMENDER⁴⁸ estudaram a biocompatibilidade da alumina utilizando animais. Os autores introduziram implantes de alumina em fêmur de ratos e mandíbula de porcos-da-índia. Após 6 e 8 meses, eles verificaram que o biomaterial foi bem tolerado pelos tecidos, em ambos os animais e locais estudados, embora a análise por espectroscopia por absorção atômica indicasse um maior nível de alumínio nos ossos dos animais testados. Segundo os autores, mais trabalhos são necessários para estabelecer o papel da alumina em longo prazo.

HAYNES et al.³⁶ investigaram a relação entre a toxicidade de partículas de metal e sua habilidade em estimular a liberação de mediadores inflamatórios implicados na reabsorção óssea. Para isso, os autores utilizaram macrófagos de peritônio de ratos, que foram expostos a partículas de liga de Ti (Ti-6Al-4V) ou de liga de cromo-cobalto. As partículas de liga de Ti mostraram uma toxicidade baixa, mesmo em alta concentração, enquanto as partículas de cromo-cobalto foram altamente tóxicas. Por outro lado, a exposição à liga de Ti induziu maior liberação de PGE₂, Interleucina 1 (Il-1), fator de necrose tumoral (TNF) e Il-6, enquanto a liga de cromo-cobalto esteve associada ao decréscimo da liberação destes mediadores.

Para determinar os efeitos do Al sobre osteoblastos de calvária de ratos, KIDDER et al.⁴⁴ acrescentaram de 10 a 50 µg (micrograma) deste elemento nos poços de cultura e estudaram a proliferação celular e a formação de colágeno. Em culturas subconfluentes, o Al

promoveu uma redução da proliferação celular. Já em culturas confluentes, o alumínio estimulou a produção de colágeno. Estas observações sugerem que o defeito da formação óssea, associado com a toxicidade do Al, pode ocorrer pela supressão da proliferação dos osteoblastos. O aumento da produção de colágeno já era esperado, pois a osteomalacia está relacionada com o aumento desta proteína.

BAGAMBISA et al.⁷ estudaram a resposta de osteoblastos a vários materiais dentários, em MEV, sobre diferentes superfícies, incluindo cerâmicas e Ti. A adesão celular foi observada nos diferentes materiais, porém, após 2 dias de cultura, as células cultivadas sobre o material In-ceram (Vita, Bad Sackingen, Alemanha), de alumina, apresentaram necrose, o que indicou um forte efeito citotóxico.

DARVELL et al.²³ estudaram a contaminação de superfícies de Ti após vários tratamentos superficiais. Os autores observaram, através de MEV e Raios-X, que a presença do Al, como contaminante superficial, devia-se ao processo de jateamento com alumina. Eles também notaram que quanto maior a pressão empregada no tratamento, maior quantidade deste elemento era detectada na superfície. A presença do Al variou de 13 a 24,3 %. Segundo os autores, a presença deste contaminante deve ser vista com cautela, pois há a possibilidade dele ser um agente causador de destruição tecidual.

MALONEY e SMITH⁵⁶ isolaram e caracterizaram partículas presentes em pacientes que apresentaram falha em próteses de quadril. Durante as cirurgias de reposição destes aparelhos, os autores removeram tecido e isolaram as partículas metálicas. Estas apresentaram um diâmetro médio de 0.7 μm . Foram encontradas, em média, 1.7 bilhão de partículas por grama de tecido de pacientes com falhas, número muito superior aos 143 milhões encontrados nos tecidos controle.

Em 1996, BORDJI et al.¹⁰ estudaram a citocompatibilidade de ligas de titânio com diferentes tratamentos de superfície. Os autores utilizaram fibroblastos e osteoblastos

humanos, oriundos de cirurgia ortopédica. A liga contendo Al e V (Ti-6Al-4V) apresentou respostas biológicas similares à outra liga contendo Al e Fe (Ti-6Al-2.5Fe), independente do tratamento superficial utilizado.

Segundo FLATEN et al.³⁰, uma vasta gama de efeitos tóxicos do Al tem sido demonstrado em plantas, animais e humanos. A toxicidade do Al é um dos principais problemas na agricultura, afetando aproximadamente 40% do solo produtivo do planeta. Em águas frescas acidificadas por chuvas ácidas, a toxicidade do Al levou a extinção de peixes. O Al também é um potente neurotóxico. Em humanos com doença renal crônica, ele causa encefalopatia, osteomalacia e anemia. Anormalidades, incluindo efeitos psicomotores e neurocognitivos, tem sido relatados em pacientes com níveis de Al no plasma acima de 50 µg/ml. Por tudo isso, várias pesquisas tem sido realizadas no mundo todo para determinar os mecanismos celulares e moleculares da toxicidade do Al.

Para JEFFERY et al.³⁸, embora nem todos os mecanismos tenham sido elucidados, estudos clínicos demonstraram que, no osso, altas doses de Al inibiram a remodelação, diminuindo tanto a atividade do osteoblasto como do osteoclasto, e produzindo osteomalacia. Porém, os autores enfatizaram que os efeitos de baixos níveis de Al em humanos são desconhecidos.

Segundo THOMPSON e PULEO⁸², íons liberados da superfície de implantes metálicos são suspeitos de contribuir para a perda de próteses ortopédicas. Por isso, os autores estudaram o papel da liga de Ti (Ti-6Al-4V) na supressão da função de osteoblastos derivados de medula óssea de ratos. Células foram cultivadas por 4 semanas e expostas a doses de solução contendo íons da liga de Ti. As soluções produziram diferenças pequenas, em relação ao controle, nos níveis de ALP e proteína total, mas afetaram significativamente a produção de osteocalcina e o conteúdo de Ca. Os autores sugerem que estes achados indicam que a

liberação de íons pelos implantes de liga de Ti podem contribuir para a falha destes dispositivos, por dificultar a deposição óssea.

WENNERBERG et al.⁸⁵ estudaram os efeitos dos materiais de jateamento e da topografia superficial na osseointegração. Os implantes foram jateados com alumina (25 e 75 μm) e óxido de titânio (25 μm). Dez animais receberam os implantes. Implantes sem tratamento algum foram usados como controle. Após 12 semanas, os animais foram sacrificados. A caracterização das superfícies mostrou que quanto maiores as partículas, maior a rugosidade. As partículas de alumina maiores apresentaram os melhores resultados em relação ao controle. Segundo os autores, os resultados indicam que a composição química dos implantes não parece ser tão importante como a topografia superficial.

Em 1998, ESPOSITO et al.²⁹ promoveram uma revisão de literatura sobre os fatores associados com a perda de implantes orais. Utilizando um formato baseado em evidências associado, quando possível, com a aplicação de meta-análise, os autores identificaram vários fatores ligados à perda de implantes. Entre eles, destacaram-se fatores endógenos, incluindo alterações locais e sistêmicas, e fatores exógenos, relacionados, entre outras coisas, com os biomateriais. A presença de contaminantes, como o Al, pode representar um risco à osseointegração. Porém, existem poucas evidências que indiquem efeitos citotóxicos devido à liberação de íons metálicos. O trauma cirúrgico excessivo, a carga prematura e a infecção são provavelmente as causas mais comuns de perda precoce de implantes, enquanto a peri-implantite (infecção marginal crônica progressiva) e a sobrecarga são provavelmente os principais fatores etiológicos para perdas tardias.

Como o osso é um dos tecidos alvos do Al, BOUGLÉ et al.¹¹ buscaram relacionar a osteopenia com variações nos níveis sanguíneos deste metal, em bebês normais ou prematuros. Segundo os autores, a mineralização óssea esteve somente associada negativamente, em prematuros, às variações nos níveis sanguíneos de Al, dentre vários

parâmetros biológicos estudados. O acúmulo precoce deste metal pode estar relacionado à função renal diminuída, devido à imaturidade renal dos bebês. Portanto, em crianças prematuras, a exposição precoce ao Al deve ser evitada.

PULEO e NANJI⁶⁸ promoveram uma revisão sobre o conhecimento vigente da interface osso-implante, enfatizando biomateriais metálicos. Segundo os autores, o Ti tem sido o material de escolha na implantodontia pela formação de uma camada estável de óxido superficial. Entretanto, estudos analíticos da superfície de implantes mostraram que a composição química desta camada superficial muda com o tempo, incorporando Ca, P e S. O aumento contínuo desta camada reflete os eventos eletroquímicos que ocorrem na interface osso-implante. Uma consequência destes eventos é a liberação de íons metálicos para os tecidos circundantes. Estes produtos acumulam-se localmente, mas também podem se disseminar sistemicamente. Conteúdos elevados de metal têm sido medidos nos tecidos periimplantares, assim como no soro e na urina. Estudos “in vitro” revelaram que íons metálicos, mesmo em doses subletais, interferem na diferenciação de osteoblastos e osteoclastos.

BELLOWS, HEERSCHÉ e AUBIN⁸ examinaram os efeitos do Al na proliferação e diferenciação celular, e na formação óssea usando cultura celular de osteoblastos de calvária de ratos. A presença de alumínio diminuiu significativamente a viabilidade das células aos 13 dias. A toxicidade foi maior nos poços contendo maior quantidade do elemento. Ao final do experimento, 300 µg de Al promoveram a desintegração dos nódulos calcificados e da matriz. A ALP, por sua vez, esteve aumentada em todas as fases, enquanto a proliferação foi prejudicada. Segundo os autores, estes resultados indicam que o Al altera a regulação da transição entre a proliferação celular e a diferenciação. Porém, em longo prazo, mostrou ser citotóxico de maneira dose-dependente.

Em 2001, VERMES et al.⁸³ estudaram a os efeitos de partículas de metais e de polímeros nas funções dos osteoblastos MG63. As células foram cultivadas com partículas de Ti, de liga de Ti e de polímeros com dimensões fagocitáveis (menos de 3 μm). As células fagocitaram as partículas e tornaram-se saturadas em 24 horas. A proliferação celular foi afetada negativamente de uma maneira dose-dependente. As partículas estimularam os osteoblastos a liberarem Il-6 e a reduzirem a síntese de colágeno tipo I. As funções suprimidas dos osteoblastos, porém, puderam ser compensadas por certos fatores de crescimento, como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) I e o TGF β 1.

LOHMANN et al.⁵¹ examinaram se a alumina, o óxido de zircônio e partículas de polimetilmetacrilato (PMMA) exercem efeitos no comportamento de células MG-63. As células foram cultivadas com meio de cultura acrescidos das partículas, com tamanhos inferiores a 3 μm . Após 24 horas, através de MEV pode-se observar células fagocitando alumina e exibindo alterações ultra-estruturais. A proliferação, atividade de fosfatase alcalina e nível de TGF- β 1 apresentaram-se reduzidos. Por outro lado, o óxido de zircônio e as partículas de PMMA aumentaram a proliferação celular e a atividade de fosfatase alcalina. Estes resultados sugerem que parece ocorrer uma supressão da função celular quando as células estão em contato com partículas de alumina.

CASSINELLI et al.¹⁷ verificaram os efeitos da composição química superficial sobre osteoblastos (SaOS-2). As amostras de Ti receberam procedimentos de limpeza superficiais, sobrando apenas uma superfície livre de tratamento, que foi considerada controle (C). A citotoxicidade foi realizada medindo-se a adesão celular. A superfície C apresentou os piores resultados. Verificou-se que esta apresentava resíduos de óleos lubrificantes. Para os autores, a influencia da composição superficial sobre o comportamento celular pode ser superior a rugosidade.

MULLER et al.⁶¹ estudaram o percentual de MBC após o jateamento da superfície de implantes com alumina ou biocerâmicas. Vinte e sete coelhos foram usados no estudo e as análises foram feitas após 7, 28 e 84 dias da instalação dos implantes. Os resultados de MBC aos 28 dias foram superiores com o uso de alumina, que promoveu uma superfície mais rugosa. Porém, aos 84 dias mais osso foi encontrado no grupo das biocerâmicas. Segundo os autores, a topografia teve um maior impacto inicial. O jateamento com as biocerâmicas promoveu, provavelmente, uma superfície bioreativa que possibilitou uma melhor resposta em longo prazo.

PIATTELLI et al.⁶⁶ estudaram a influência do uso de implantes com Al residual nas suas superfícies, utilizando coelhos. Quarenta e oito implantes foram jateados com partículas de alumina de 100-120 μm , a 5 atm de pressão, por 1 minuto. Deste total, vinte e quatro implantes foram submetidos a um processo de descontaminação em ultra-som e formaram o grupo controle. Cada animal recebeu dois implantes de cada grupo. Após 4 semanas os animais foram sacrificados e os implantes removidos. Foram feitas as seguintes análises: quantificação das partículas na superfície dos implantes, contato osso-implante e células multinucleadas ou osteoclastos presentes na superfície ou em até 3 mm de distância. Os resultados mostraram uma presença significativa de Al residual em relação ao controle, porém não foram encontradas diferenças no contato osso-implante ou na presença de osteoclastos. Portanto, segundo os autores, o Al residual na superfície dos implantes de Ti não tem efeito na osseointegração, em coelhos.

ROSA e BELOTI⁷⁴ avaliaram o efeito da rugosidade superficial e da composição química do Ti na adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos de ratos. As células foram cultivadas em Ti cp ou em uma liga composta de Ti, Al e V. Quatro rugosidades diferentes, após jateamento com alumina, com partículas de diferentes tamanhos, foram estudadas. A adesão celular não foi afetada pela composição química nem pela rugosidade. A

proliferação celular e a diferenciação (atividade de ALP e formação de nódulos calcificados) foram afetadas apenas pela composição química. O Ti cp apresentou uma melhor resposta biológica, pois a atividade de fosfatase alcalina e a formação de nódulos calcificados foram maiores neste material. Estes resultados sugerem que o Ti cp otimiza a diferenciação dos osteoblastos de ratos. Os piores resultados encontrados na liga podem ser provenientes de um possível efeito citotóxico do Al ou do V.

Em 2004, GUIZZARDI et al.³⁴ verificaram se diferentes tratamentos superficiais têm influência na resposta de osteoblastos humanos de mandíbula. Seis tratamentos diferentes foram realizados: P – polimento, TPS, C100 e C150– jateamento com alumina (100 e 150 μm , respectivamente) e ataque ácido e B60 e B120 - jateamento com óxido de zircônio (60 e 120 μm , respectivamente). As características superficiais foram estudadas por MEV e rugosímetro, e a presença de substâncias residuais foi determinada por espectroscópio Raman. As células foram cultivadas por 1, 6 e 12 dias para o estudo da proliferação e atividade de fosfatase alcalina. As superfícies jateadas e tratadas por ácido apresentaram melhores performances que as polidas e TPS. Porém, as superfícies B60 e B120 foram superiores as C100 e C150, mesmo apresentando rugosidades semelhantes. Segundo os autores, a presença de alumina, detectada pelo espectroscópio, pode explicar os resultados inferiores das superfícies C100 e C150.

DINIZ et al.²⁵ caracterizaram parâmetros relativos a superfícies de Ti submetidas a jateamento com alumina por meio de processamento e análise digital de imagem no programa KS400. Três imagens digitais obtidas em MEV de amostras jateadas e tratadas com HF a 4% foram processadas e analisadas para obtenção de parâmetros digitais e quantificação da alumina residual. Os parâmetros estudados foram área total ocupada pela alumina, perímetro das partículas e o fator de forma circular. Observou-se que o tratamento químico com HF removeu de maneira significativa a alumina, porém resíduos foram identificados pelo EDS. A

área total ocupada pela alumina nas amostras foi de 0.7%, o perímetro médio foi de 81.61 μm e a média do fator de forma circular foi de 0.60.

SADER et al.⁷⁶ estudaram o efeito de 3 tratamentos distintos, realizados em superfície de Ti, sobre a adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos de camundongos. O uso da lixa (SiC 600) promoveu ranhuras paralelas. O jateamento com alumina (65 μm) acarretou em uma superfície rugosa, contendo alumina, que não foi quantificada. A aplicação do HF a 4% por 60 s promoveu uma superfície regular. Células de fêmur dos animais foram cultivadas sobre as superfícies. Observou-se que os osteoblastos aderiram em todas as superfícies. Porém, nas superfícies rugosas eles não se espalharam completamente. Além disso, adquiriram uma morfologia poligonal e apresentaram uma proliferação reduzida. Os autores afirmaram que as superfícies rugosas alteraram o comportamento celular, porém sem bloquear seu fenótipo. Já a presença da alumina não afetou o comportamento dos osteoblastos.

3. PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo são:

1. Caracterizar amostras de titânio com diferentes tratamentos mecânicos e/ou químicos pelo estudo da topografia e da composição química das superfícies.
2. Verificar os efeitos das amostras de titânio, com rugosidades distintas e quantidades variadas de alumina, na adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos derivados de osso alveolar humano, e na formação de matriz mineralizada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação das superfícies de titânio

As superfícies de Ti foram preparadas no Laboratório de Engenharia Mecânica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Foram utilizadas duas chapas de Ti grau 2 com 250 x 250 mm de lado e 1 mm de espessura. Uma das chapas foi jateada com óxido de alumínio (Al_2O_3 – alumina), com os seguintes parâmetros: partículas com granulometria média de 65 μm , pressão de jateamento (sucção – indireta) 414 kPa (ou 4 atm), distância do bico para as chapas 30 cm, e ângulo de $60^\circ \pm 10$, por 1 minuto. Em seguida, as chapas - jateada e não jateada - foram cortadas em pequenas amostras de 9 x 9 mm de lado.

As amostras não jateadas foram submetidas a tratamento manual com lixa metalográfica de SiC número 600 e pressão constante por 10 segundos, sob água corrente. Este procedimento visou padronizar a superfície destas amostras. Esta superfície, apenas lixada, foi usada como controle.

Os dois grupos de amostras (lixadas e jateadas) foram então submetidas a tratamentos químicos com soluções em duas etapas, como descrito no quadro 1, resultando em 5 tipos de superfícies:

L – somente lixada (controle),

L1 – lixada e tratada pelo HF a 4% por 60 s mais HF a 4%/H₂O₂ a 8% por 15 s,

J – somente jateada com alumina,

J1 - jateada com alumina e tratada pelo HF a 4% por 13 s mais HF a 4%/H₂O₂ a 8% por 15 s,

J2 – jateada com alumina e tratada pelo HF a 4% por 60 s mais HF a 4%/H₂O₂ a 8% por 15 s.

Quadro I: Superfícies e condições empregadas no ataque químico das amostras de titânio

Superfícies	Composição e condições de ataque
L1 e J2	1ª etapa: HF a 4% em volume por 60 segundos, em capela à temperatura ambiente; 2ª etapa: HF a 4% em volume e H ₂ O ₂ a 8% em volume durante 15

	segundos, em capela à temperatura ambiente.
J1	1ª etapa: HF a 4% em volume por 13 segundos, em capela à temperatura ambiente; 2ª etapa: HF a 4% em volume e H ₂ O ₂ a 8% em volume durante 15 segundos, em capela à temperatura ambiente.

Todas as amostras foram então submetidas a um processo de limpeza metalográfica, com o objetivo de remover gorduras, graxas ou outras impurezas, oriundas do processo de preparação das amostras. As amostras eram colocadas em ultra-som com acetona pró-análise (PA), álcool 70% e água destilada, respectivamente, por 15 minutos cada. Posteriormente, todas eram levadas à estufa por 24 horas, a 37° C. Para esterilização, as amostras foram embaladas em envelopes auto-selantes (Medstéril, São Paulo, Brasil). As amostras foram esterilizadas em autoclave modelo 2340 MK (Tuttnauer, São Paulo, Brasil) a 121° C por 20 minutos, em 103 kPa, seguindo recomendação padrão para esterilização⁶⁹.

Caracterização das superfícies de titânio

Características topográficas

Os corpos de prova foram analisados por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), modelo DSM 960, (Zeiss, Oberkochen, Alemanha), operando a 20 kV, 80 µA e distância de trabalho de 13 mm, para estudar as características morfológicas das diferentes superfícies. Foram obtidas imagens, por operador “cego”, de maneira aleatória, detectadas de elétrons secundários (SE) para observar as diferentes morfologias superficiais decorrentes dos tratamentos distintos. Foram utilizados aumentos de 200 e 1000 vezes. Adicionalmente,

imagens foram geradas a partir da detecção de elétrons retroespalhados (BSE), com aumento de 200 vezes, para tentar identificar os resíduos de alumínio na superfície das amostras jateadas por alumina, pois elementos de número atômico menor ($Al = 13$ vs $Ti = 22$) aparecem na imagem em MEV como áreas mais escuras²⁴.

Rugosidade

Para o estudo da rugosidade média das superfícies (parâmetro R_a), foi utilizado um rugosímetro, modelo SJ 201P (Mitutoyo, Miyazaki, Japão), com ponta de diamante e capacidade da unidade de leitura de 0.01 a 100 μm . Foram realizadas 10 medidas horizontais e 10 verticais, de 4 mm cada, em 3 amostras distintas de cada grupo, totalizando 60 leituras por grupo.

Composição química (EDS)

A composição química das superfícies das amostras de Ti, com diferentes tratamentos, foi estudada no mesmo aparelho de MEV citado anteriormente que é dotado de um sistema analítico de espectroscopia por dispersão de energia (EDS). Este teste foi realizado para confirmar a presença de alumina residual, identificada nas imagens (modo BSE) como regiões mais escuras.

Quantificação da alumina residual através do processamento e análise digital de imagem (KS400)

As amostras de Ti que apresentavam alumina residual na sua superfície, identificada pelo EDS, foram submetidas a processamento e análise digital de imagem no programa KS400 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Foram analisadas três amostras distintas por grupo. Dez imagens foram obtidas aleatoriamente de cada uma delas, por operador “cego”, em MEV, modo BSE, formato TIFF (512x480 pixels), totalizando trinta imagens por grupo. As imagens, então, foram processadas e analisadas no programa para a obtenção de parâmetros digitais e quantificação da fase residual da alumina. A análise digital foi realizada por apenas um examinador experiente. As imagens foram filtradas para reduzir ruído eletrônico e discriminadas por processo de segmentação adaptativa⁵⁵ para identificar as regiões mais escuras. Posteriormente, foi estabelecido como parâmetro a detecção somente de objetos (resíduos de alumina) com dimensão acima de 15 pixels de tamanho.

A área média ocupada pela alumina foi estabelecida por apenas um avaliador (“cego”). Além disso, também foram estudados o diâmetro médio das partículas e o número de regiões de alumina.

Biocompatibilidade “in vitro”

Cultura de células

Foram obtidos fragmentos (explantes) de osso alveolar humano, de um doador saudável, com 37 anos de idade, que fora submetido a procedimento cirúrgico oral de rotina, realizado na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, após

aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (processo 2003.1.1274.58.3). As células ósseas foram isoladas e cultivadas de acordo com uma combinação de dois métodos descritos na literatura^{54, 57}. Os explantes de osso alveolar foram transportados em tubos de centrifuga estéreis, contendo meio para transporte composto de: 38 ml de Meio Mínimo Essencial (α -MEM - Gibco, NY, EUA), 2 mL de Gentamicina (10.000 μ g/ml - Gibco, NY, EUA) e 500 μ L de Fungizone (250 μ g/ml - Gibco, NY, EUA). Em fluxo laminar, os explantes eram colocados em placas de Petri autoclavadas e triturados com trituradores de osso. Posteriormente, o material era transferido para tubos de centrifuga, contendo 5 ml de colagenase tipo II (Gibco, NY, EUA) (1 mg/1 ml de PBS), filtrada com seringa e filtro. Os tubos então eram colocados em banho-maria a 37°C, sob agitação constante, para iniciar o processo de digestão. Após 30 min, o sobrenadante era removido e transferido para um outro tubo de centrifuga, contendo uma quantidade igual de Meio Total Suplementado (MTS)¹, para inativar a colagenase. Uma nova alíquota de colagenase tipo II era adicionada ao explante e levada novamente ao banho-maria, repetindo todo o processo mais 5 vezes. As frações 1 e 2 eram descartadas, e as 4 restantes eram centrifugadas a 200 g, por 5 min.

As células derivadas do osso alveolar e os explantes eram então cultivados em garrafas de 75 cm² (Falcon, NJ, EUA), contendo MTS, mantidas em estufa a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até a subconfluência, quando eram removidas com 1mM de EDTA (Gibco, NY, EUA) associado a 0.25% de tripsina (Gibco, NY, EUA). As células, sempre na primeira passagem, eram então transferidas para placas de 24 poços (Falcon, NJ, USA), contendo as amostras de Ti, na quantidade de 2x10⁴ células/amostra por poço, para a realização dos experimentos. Foram utilizadas 4 amostras de cada grupo para cada avaliação realizada. Poços sem amostras de Ti foram utilizados para controle das condições de cultura.

¹ 200 ml de Meio básico contendo: 170 ml de α -MEM – Gibco, 30 ml de Soro Fetal Bovino – Gibco, 1 ml de Gentamicina – Gibco e 240 μ l de Fungizone – Gibco, suplementado com 2 ml de Dexametasona 10⁻⁵ M (Sigma, MO, EUA) e 2 ml de β -glicerofosfato (Sigma).

Morfologia celular por fluorescência direta e localização de proteínas da matriz extracelular não-colágena (fibronectina – FN) por imunofluorescência indireta

Para a imunolocalização da FN, as células foram cultivadas por 24 horas sobre as diferentes superfícies de Ti. As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0.1 M, pH 7.2, por 10 min à temperatura ambiente. As células foram então rotineiramente processadas para imunofluorescência, como descrito por OLIVEIRA et al.⁶³. Resumidamente, a permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5%, em tampão fosfato, durante 15 min, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5%, em PBS, durante 30 min. Foi incubado anticorpo monoclonal primário para detecção de FN (1:100, clone IST-3, Sigma, MO, EUA), por 1 hora, seguido de anticorpo secundário conjugado fluoróforo (1:200, Alexa Flúor 594, Molecular Probes, OR, EUA) (em vermelho) por 50 minutos. Para a visualização dos limites celulares e dos núcleos de células foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, OR, EUA) (em verde), 1:200, e “4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride” (DAPI, Molecular Probes, OR, EUA) (em azul) a 300 nM, por 5 min. A substituição dos anticorpos primários por PBS foi usada como controle negativo. Após montagem de lamínula de vidro sobre os discos, com meio de montagem “antifade” (Vectashield, Vector Labs, CA, EUA), as marcações foram analisadas por epiluminação em microscópio de fluorescência (Leica, Bensheim, Alemanha). As imagens adquiridas por câmera digital (Leica DC 300F), por um operador “cego”, foram armazenadas em arquivo TIFF.

Adesão celular

Para a avaliação da adesão celular, as células foram cultivadas por 24 horas. Os poços eram lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS, Gibco, NY, EUA), aquecida a 37°C, para remover as células não aderidas. Em seguida, os poços eram preenchidos com 1,5 ml de uma solução de EDTA a 1 mM, colagenase a 1,3 mg/ml e tripsina a 0,25% (Gibco, NY, EUA) para remover as células aderidas, etapa que foi monitorada pela observação em microscópio de fase invertido (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Para este procedimento, uma solução contendo 19 ml de tripsina (Gibco, NY, EUA) a 0.25%, 1 mM de EDTA (Gibco, NY, EUA) e 0.5 ml de colagenase tipo II - (1.3 mg/ml – Gibco, NY, EUA) foi preparada. Após 10 minutos a 37°C, 0.5 mL de MTS era colocado em cada poço para inativar a solução. Amostras de 50 µl desta mistura eram transferidas para um hemocitômetro (Housser Scientific Company, PA, EUA), observadas em microscópio de fase invertido e contadas. A adesão celular foi determinada pela porcentagem de células aderidas, em relação ao número inicial de células plaqueadas (2×10^4 células/amostra).

Proliferação Celular

Ao final de 1 e 10 dias, o número de células foi contado como descrito para a adesão celular. Em 10 dias, alíquotas de 100 µl da suspensão de células foram misturados com o mesmo volume de azul de Tripán a 1% (Sigma, MO, EUA) e as células viáveis e não-viáveis foram detectadas utilizando um hemocitômetro (Housser Scientific Company, PA, EUA). A proliferação foi expressa como “doubling time”, ou seja, o tempo necessário para o número de células dobrar entre os dias 1 e 10, como descrito por PATTERSON Jr.⁶⁵ e a viabilidade como % células viáveis.

Para o “doubling time”, foi usada a seguinte fórmula:

Número de horas

$$\log_2 (A) - \log_2 (B)$$

“A” representa o número final de células aderidas, contadas no dia 10, e “B” representa o número inicial de células aderidas, contadas após 24 horas. O número de horas é 216 (240 – 24).

Conteúdo de proteína total

A dosagem de proteína total foi realizada aos 7, 14 e 21 dias em cultura, seguindo o método de LOWRY et al.⁵³. Após a remoção do meio de cultura, os poços eram lavados três vezes com PBS aquecida a 37°C e preenchidos com 2 ml de água deionizada. As amostras eram submetidas a 5 ciclos de choque térmico, cada um consistindo em 20 min a -20°C e 15 min a 37°C. Ao final dos ciclos, 1 ml do lisado de células de cada poço era transferido para tubos de ensaio, misturado com 1 ml de solução de Lowry (Sigma, MO, EUA) e deixado em repouso à temperatura ambiente por 20 min. Após esse período, era adicionado a cada tubo 0,5 ml da solução de reagente de fenol de Folin e Ciocalteau (Sigma, MO, EUA). Os tubos, então, eram deixados em repouso à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, a absorbância de cada tubo foi medida em um espectrofotômetro (CE3021, Cecil, Cambridge, Inglaterra) utilizando o comprimento de onda de 680 nm. A concentração de proteína total em cada poço foi calculada a partir de uma curva padrão feita com albumina bovina (Sigma, MO, EUA).

Para o conteúdo de proteína total ser expresso em µg/ml foi empregada a seguinte fórmula:

Leitura da amostra x FATOR = μg de proteína/ml.

O fator foi calculado a partir de vários teste de curva padrão realizados com albumina bovina (dados não apresentados). Foram feitas 5 leituras no espectrofotômetro com quantidades conhecidas da proteína (variando de 25 a 400 $\mu\text{g/ml}$).

A média encontrada para estas leituras foi de 198, sendo este, portanto, o fator de normalização.

Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de ALP foi medida através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial (Labtest Diagnostica SA, MG, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes. Em todos os tubos eram adicionados 50 μl de substrato e 0,5 ml de tampão dietanolamina a 0,3 mmol/ml, pH 10.1. No tubo padrão, foram acrescentados 50 μl da solução padrão. Os tubos eram mantidos a 37°C por 2 min. Em seguida, era adicionado, em cada tubo teste, 50 μl do lisado de células dos mesmos poços utilizados para medida da proteína total. Os tubos eram mantidos a 37°C por 10 minutos. Após esse período, eram adicionados em todos os tubos (branco, padrão e testes), 2 ml do reagente de cor (Na_2CO_3 0,09 mmol/ml e NaOH 0,25 mmol/ml). Em seguida a absorbância era medida em um espectrofotômetro (CE3021 – Cecil, Cambridge, Inglaterra) utilizando o comprimento de onda de 590nm. A atividade de ALP, μmol de timoftaleína/h/ml, foi calculada a partir da medida do tubo padrão.

Os resultados inicialmente foram expressos em U/L, de acordo com a formula 1:

$$A = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 45 \text{ (constante do fabricante)}$$

Para expressá-los em $\mu\text{Mol timolftaleína/h/ml}$ foi utilizada a fórmula 2:

$$B = \frac{A \times 60 \text{ (min)}}{1000 \text{ (mL)}}$$

A atividade de ALP foi normalizada pelo conteúdo de proteína total. Para isso, foi utilizada a fórmula 3:

$$\text{Fosfatase } (\mu\text{Mol timolftaleína/h/mg de proteína}): \frac{B}{\mu\text{g de proteína/mL (poço)}} \times 1000$$

Formação da matriz mineralizada

Após 21 dias de cultura, as células eram lavadas 3 vezes em PBS a 37°C. Após estes procedimentos, eram acrescentados aos poços 2 ml de formaldeído a 10%, para fixação do material. As placas eram mantidas em temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente era promovida a desidratação, com uma seqüência de banhos em álcool 30%, 50%, 70% e 96%, por 1 hora cada. Eram colocados 2 ml de álcool por vez nos poços. No final, os 2 ml do álcool 96% eram removidos e as placas eram deixadas em temperatura ambiente para secagem. Após a secagem, 2 ml de corante vermelho de alizarin (Sigma, MO, EUA), na concentração de 2 mg/ml (diluído em água destilada) eram colocados nos poços. O corante, que cora nódulos

ricos em Ca, era mantido nos recipientes por 10 min. Após este tempo, os poços eram lavados em água corrente. As placas eram deixadas para secagem em temperatura ambiente.

Quantificação da matriz mineralizada por processamento e análise digital de imagem (KS400)

Imagens foram obtidas em MEV (aumento 1000X) e a presença do Ca e P foi avaliada pelo EDS.

Para quantificação da matriz mineralizada, dez imagens eram capturadas de forma aleatória de cada amostra, por operador “cego”, sendo 4 amostras por grupo (n= 40), com câmera digital Leica (DC 300F) acoplada em microscópio de fluorescência (Leica, Bensheim, Alemanha) com aumento padrão de 10 vezes, e armazenadas em formato TIFF (512x480 pixels). As imagens eram então submetidas a processamento e análise digital no programa KS 400 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Novamente a análise digital foi realizada por apenas um examinador experiente. As imagens foram filtradas para reduzir ruído eletrônico e discriminadas por processo de segmentação adaptativa⁵⁵ para identificar as regiões destacadas em vermelho.

A área média ocupada pela matriz mineralizada foi estabelecida por apenas um avaliador (“cego”). A quantificação dos nódulos foi calculada como porcentagem da área total das amostras de Ti.

Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Na comparação entre vários grupos (3 ou mais), optou-se pela análise de variância (ANOVA), que foi complementada pelo teste de comparação múltipla de Duncan. O teste t para amostras

independentes foi usado quando apenas dois grupos distintos foram comparados. O valor de p foi estabelecido em 0.05.

5. RESULTADOS

Características topográficas (MEV)

A figura 1 mostra os aspectos micrográficos gerais das superfícies estudadas, obtidos em MEV, modo SE, aumento de 200 X. Na figura 1A, pode-se observar a morfologia superficial do Ti sem tratamento algum. Esta superfície não foi estudada por não apresentar um padrão de rugosidade. Dentre todas as outras superfícies analisadas, a única com características anisotrópicas foi à superfície L, que apresentou uma orientação preferencial (figura 1B), após o processo de lixamento. Na figura 1C, pode-se observar que a aplicação do HF eliminou a orientação preferencial das ranhuras promovidas pelo lixamento, conferindo a esta superfície (L1) uma característica isotrópica. Após o processo de jateamento com alumina, pode-se observar uma superfície (J) isotrópica bastante irregular, com gumes evidentes por toda a sua extensão (figura 1D). O ataque com HF, por 13 s (J1 - figura 1E) e 60 s (J2 - figura 1F), tornou as superfícies mais homogêneas e regulares, mantendo a rugosidade aparente.

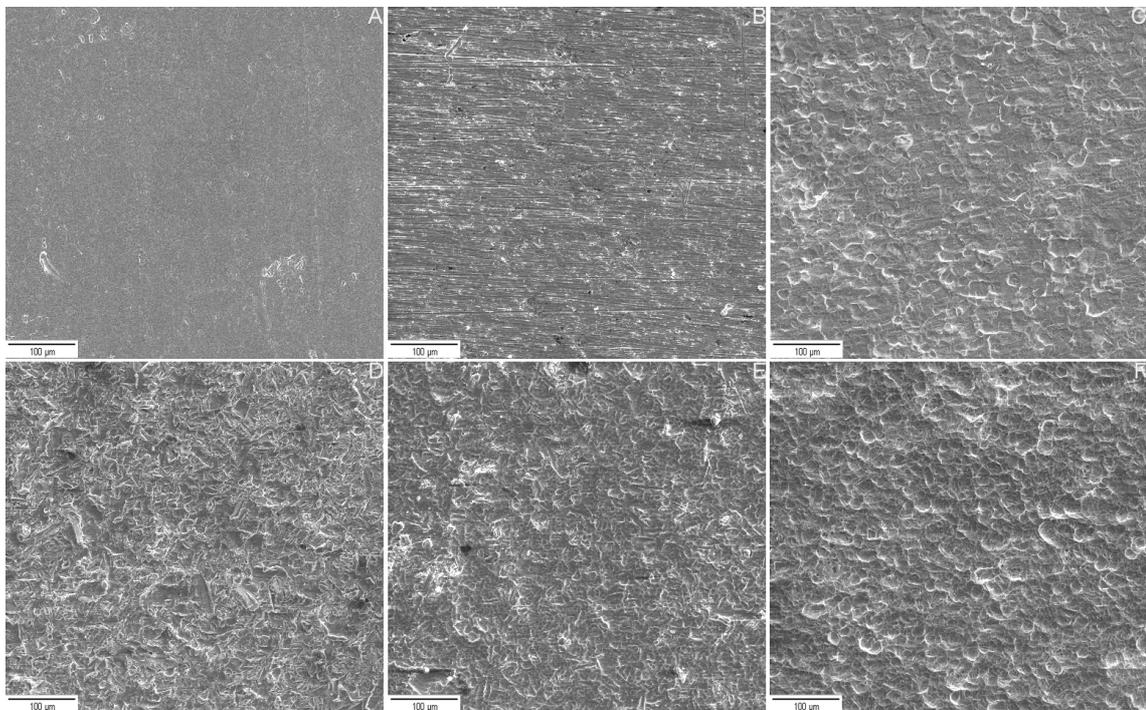


Figura 1. Aspectos micrográficos das superfícies de titânio. Figura 1A: sem tratamento. Figura 1B: lixada (L). Figura 1C: lixada e atacada com HF a 4% por 60 segundos (L1). Figura 1D: jateada com alumina (J). Figura 1E: jateada e atacada com HF a 4% por 13

segundos (J1). Figura 1F: jateada e atacada com HF a 4% por 60 segundos (J2). Aumento original: 200 X, modo SE.

Os aspectos micrográficos das superfícies podem ser observados com mais detalhes na figura 2 (aumento 1000 X, modo SE). A falta de um padrão, na superfície sem tratamento, torna-se mais evidente (figura 2A). As ranhuras decorrentes do primeiro tratamento mecânico, apenas com lixa (L), podem ser melhor visualizadas na figura 2B. Na figura 2C, pode-se verificar nitidamente a ação do HF na superfície, removendo as orientações preferenciais oriundas do lixamento. Na figura 2D, pode-se ver com bastante detalhe o resultado do jateamento com alumina (J). Os gumes e depressões são bem evidentes. A aplicação do HF por 13 s (J1) e por 60 s (J2) tornou as superfícies mais regulares e homogêneas, como pode ser visto nas figuras 2E e F, respectivamente.

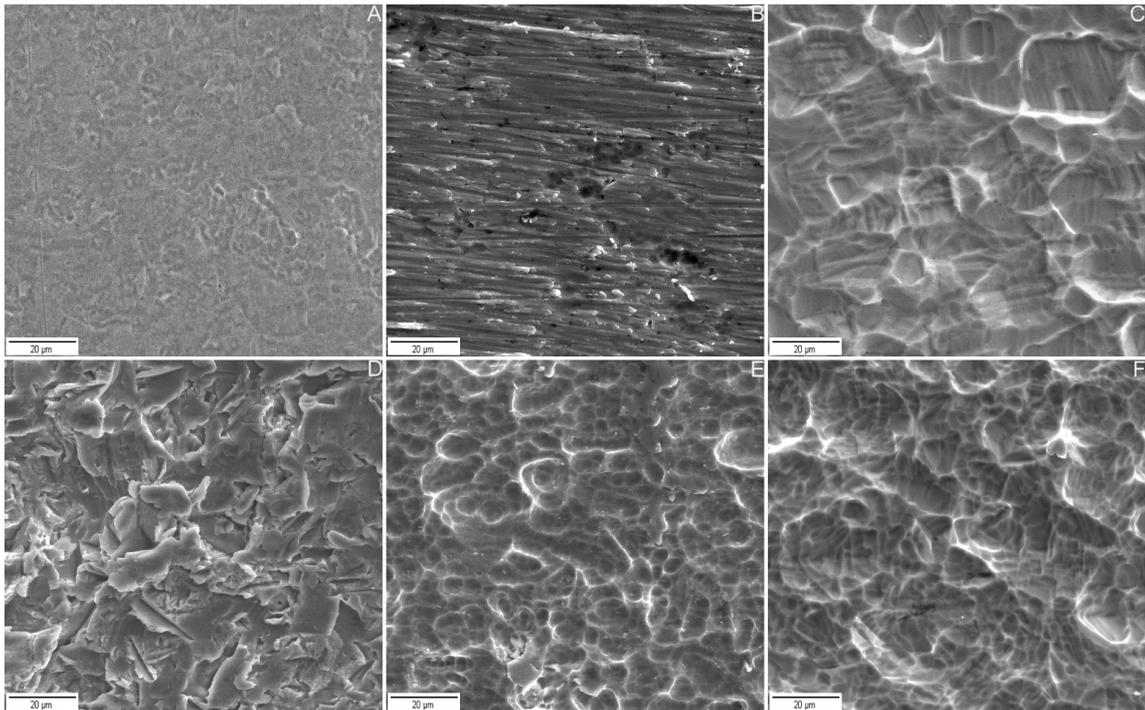


Figura 2. Aspectos micrográficos das superfícies de titânio em maior aumento. Figura 2A: sem tratamento. Figura 2B: L. Figura 2C: L1. Figura 2D: J. Figura 1E: J1. Figura 2F: J2. Aumento original: 1000 X, modo SE.

Rugosidade

A rugosidade das superfícies testadas, observadas nas figuras 1 e 2 (exceto a sem tratamento), obtida após as 60 leituras de cada grupo, encontra-se na tabela 1. Pode-se observar uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA: $F= 1553.79$; $p < 0.0001$). O teste de comparação múltipla de Duncan mostrou que não havia diferença entre as superfícies J, J1 e J2. No entanto, J, J1 e J2 eram estatisticamente mais rugosas que L e L1. Pôde-se observar também que a superfície L apresentou a menor rugosidade entre todas as superfícies. Após a aplicação do HF, houve uma alteração na topografia superficial, aumentando significativamente a rugosidade, pois L1 é maior que L. Este fato não foi observado nas superfícies jateadas (tabela 1).

Tabela 1. Média (\pm DP), em μm , da rugosidade (Ra) das diferentes superfícies.

	L n= 60	L1 n= 60	J n= 60	J1 n= 60	J2 n= 60
*Ra	0.25 (\pm 0.06)	0.52 (\pm 0.04)	1.00 (\pm 0.07)	0.98 (\pm 0.03)	0.99 (\pm 0.08)

*Diferença estatisticamente significativa entre os grupos. $J=J1=J2>L1>L$.

Composição química (EDS)

A alumina foi facilmente visualizada nas imagens em MEV, modo BSE, na superfície J (figura 3A), apresentando-se como regiões mais escuras. Embora o ataque de HF a 4% por 13 segundos (J1) tenha removido significativamente a alumina, este contaminante ainda podia ser observado (figura 3B). Na figura 3C, que corresponde à superfície jateada e atacada com HF a 4% por 60 segundos (J2), a alumina não foi visualizada, indicando a eficácia deste tratamento químico na remoção do contaminante.

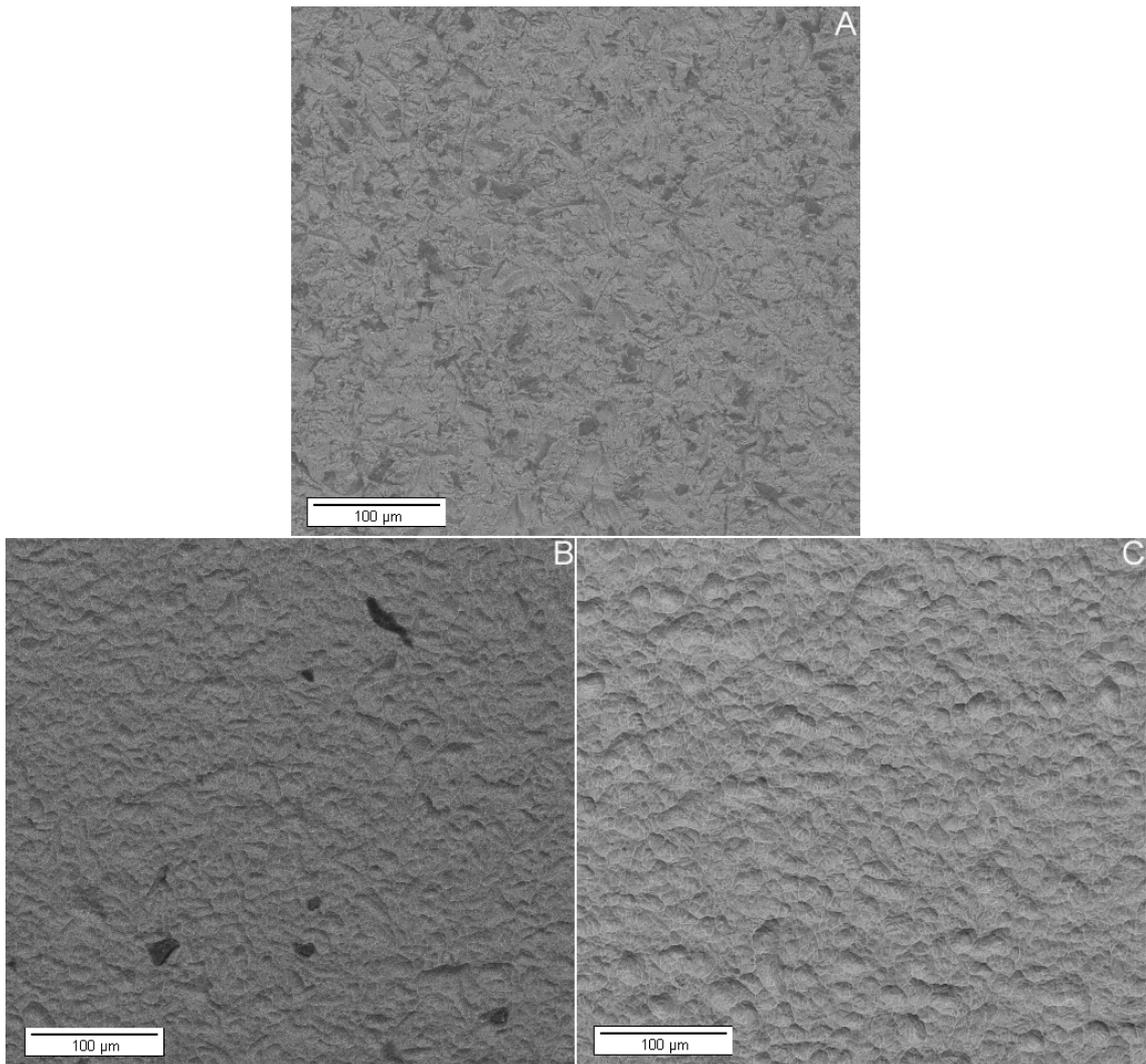


Figura 3. Aspectos micrográficos das superfícies jateada (J – em A), jateada e atacada com HF por 13 segundos (J1 – em B) e jateada e atacada com HF por 60 segundos (J2 – em C). Notar as regiões escuras em A e B que correspondem à presença de contaminantes. Aumento original: 200 X, modo BSE.

A análise semiquantitativa (EDS) confirmou a presença de alumínio somente nas amostras dos grupos J e J1, figura 4A e 4B, respectivamente. No outro grupo (J2), este elemento não foi detectado (figura 4C).

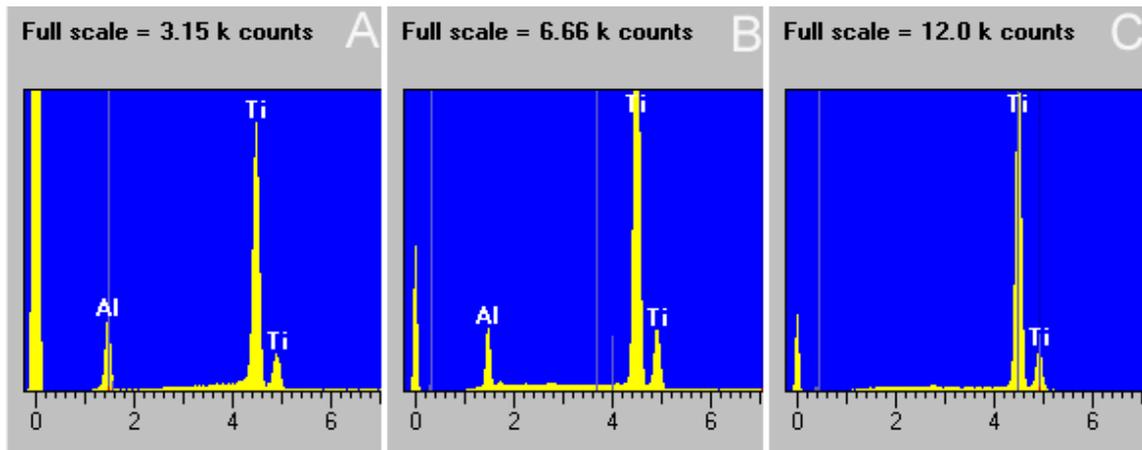


Figura 4. Espectros de EDS das superfícies jateadas. Pode-se observar a presença de Al em A (grupo J) e em B (grupo J1). Em C, que corresponde à superfície jateada e atacada por HF a 4% por 60 segundos (grupo J2), este elemento não foi detectado.

Quantificação da alumina (KS400)

Os resultados obtidos da área ocupada pelas partículas residuais nas trinta imagens dos grupos J e J1 foram analisados após o processamento e a análise digital das imagens (figura 5). Nesta figura, em A, pode-se observar uma imagem representativa, obtida da superfície J. A presença marcante do contaminante (alumina), como regiões mais escuras, pode ser facilmente visualizada. A figura 5B mostra uma imagem representativa da superfície J1, onde também se pode perceber a presença da alumina, embora em menor número. Para promover a análise das imagens pelo KS400, foi realizado o processamento da mesma, conforme descrito anteriormente, selecionando apenas regiões acima de 15 pixels (figura 5C e D). No final, com a inversão dos tons (claro/escuro – binarização), as imagens estavam prontas para a análise digital (figura 5E e F). Este processo foi repetido em todas as imagens.

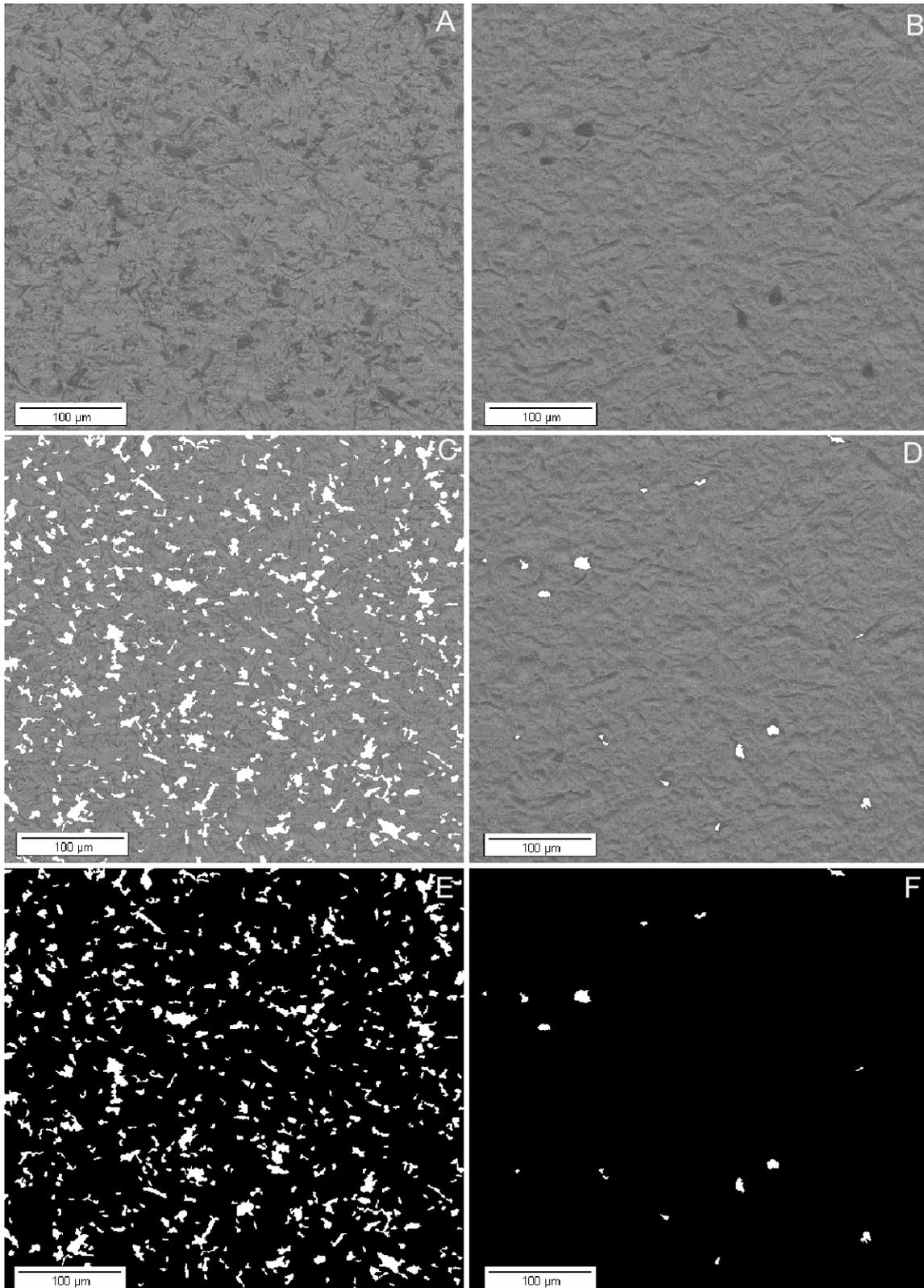


Figura 5. Aspectos micrográficos das superfícies J e J1. Em A e B, imagens iniciais das superfícies. Em C e D, identificação das regiões acima de 15 pixels. Em E e F, inversão dos tons (claro/escuro - binarização) e quantificação da alumina. Aumento original: 200 X, modo BSE.

A análise digital mostrou que as superfícies J e J1 apresentaram valores para a área média ocupada pela alumina de 9.72% (± 0.50) e 0.22% (± 0.13), respectivamente (tabela 2). A diferença encontrada entre as superfícies foi significativa ($p < 0.0001$). O número de regiões também apresentou uma redução significativa ($p < 0.0001$) com a aplicação do HF, porém o perímetro das partículas manteve valores semelhantes ($p > 0.05$) (tabela 2).

Tabela 2. Média (\pm DP) dos valores da área, diâmetro das partículas e número de regiões ocupadas pela alumina nas diferentes superfícies.

Grupos	Área (%) n= 30	Diâmetro (μm) n= 30	Número de regiões n= 30
J	9,72 ($\pm 0,50$)*	11,66 ($\pm 7,47$)	521,07 ($\pm 20,84$)*
J1	0,22 ($\pm 0,13$)	10,94 ($\pm 6,21$)	11,07 ($\pm 6,03$)

Obs. Nos grupos L, L1 e J2 a alumina não foi detectada.

*Diferença estatisticamente significativa entre os grupos J e J1.

Biocompatibilidade “in vitro”

Morfologia celular por fluorescência direta e localização de proteínas da matriz extracelular não-colágena (fibronectina – FN) por imunofluorescência indireta

Através da imunolocalização da FN, pode-se identificar este componente da matriz não colágena, em vermelho, indicando a participação ativa desta glicoproteína na adesão celular. Com a marcação adicional da actina (citoesqueleto), em verde, e dos núcleos, em azul, pode-se visualizar a forma das células aderidas à superfície não-transparente dos discos de Ti. No final, devido as diferentes colorações, pode-se perceber que as células apresentavam-se aderidas e espalhadas, apresentando núcleos proeminentes e redondos em todas as superfícies testadas, sem uma diferença aparente entre elas (figura 6).

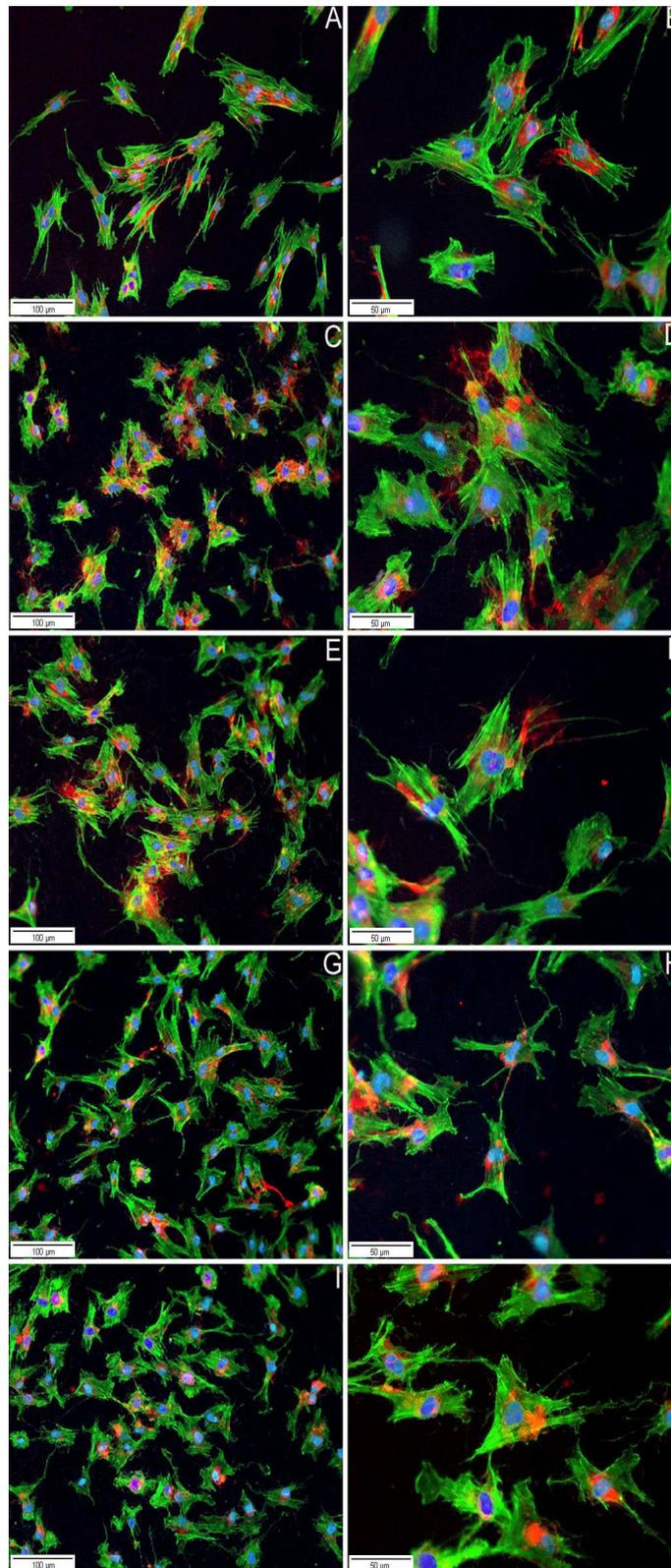


Figura 6. Aspectos morfológicos das células osteoblásticas nos diferentes materiais após 24 horas. Superfícies L (A e B), L1 (C e D), J (E e F), J1 (G e H) e J2 (I e J). Notar que não parece haver diferenças morfológicas nas superfícies distintas. De maneira geral, as células apresentam-se espalhadas (citoplasma em verde), com núcleos proeminentes e redondos (em azul), e aderidas (FN em vermelho). São observados numerosos contatos entre as

membranas celulares de células adjacentes. Aumentos originais: 20 e 40 X (coluna da esquerda e coluna da direita, respectivamente).

Adesão celular

A adesão celular não foi afetada pelas diferentes superfícies de Ti (ANOVA: $F= 2.21$; $p= 0.12$). Os dados são apresentados na figura 7.

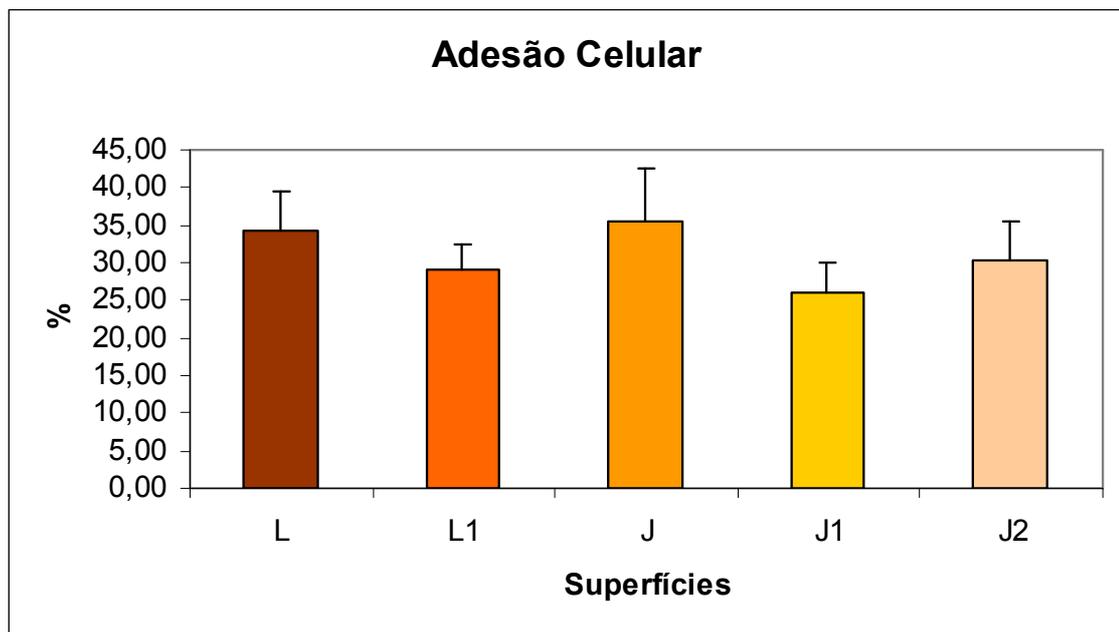


Figura 7. Média (e DP) da adesão celular ($n= 4$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($p= 0.12$).

Proliferação celular

A proliferação celular não foi afetada pelas diferentes superfícies de Ti (ANOVA: ANOVA: F= 1.45; p= 0.27). Os dados são apresentados na figura 8.

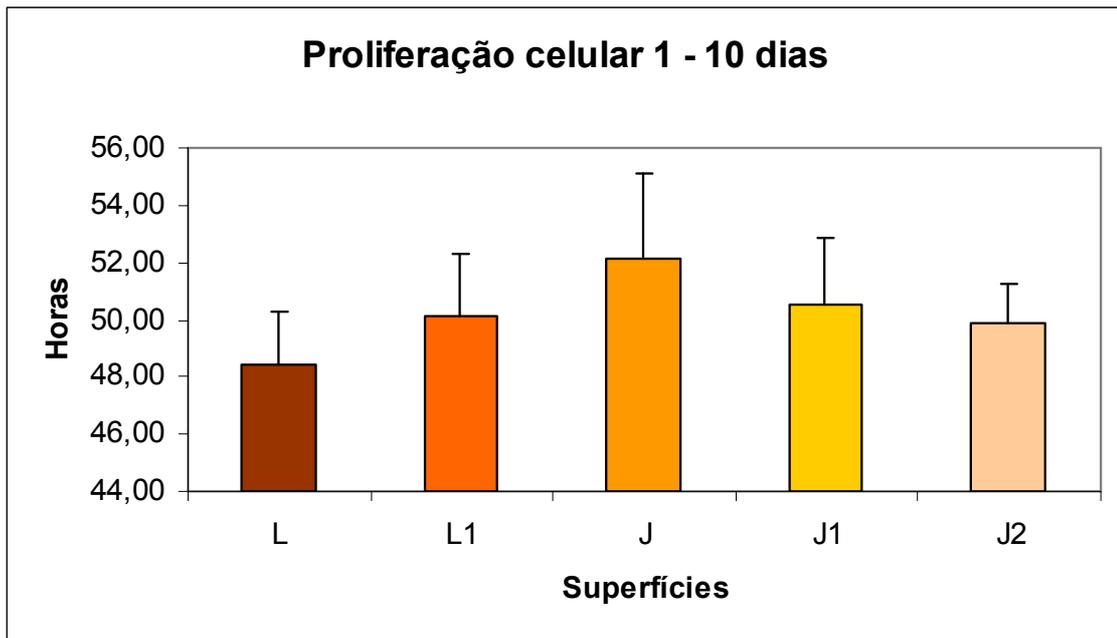


Figura 8. Valores médios (e DP) do doubling time (n= 4). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (p= 0.27).

Viabilidade celular

A viabilidade celular não foi afetada pelas diferentes superfícies de Ti (ANOVA: $F=0.16$, $p=0.95$). Os dados são apresentados na figura 9.

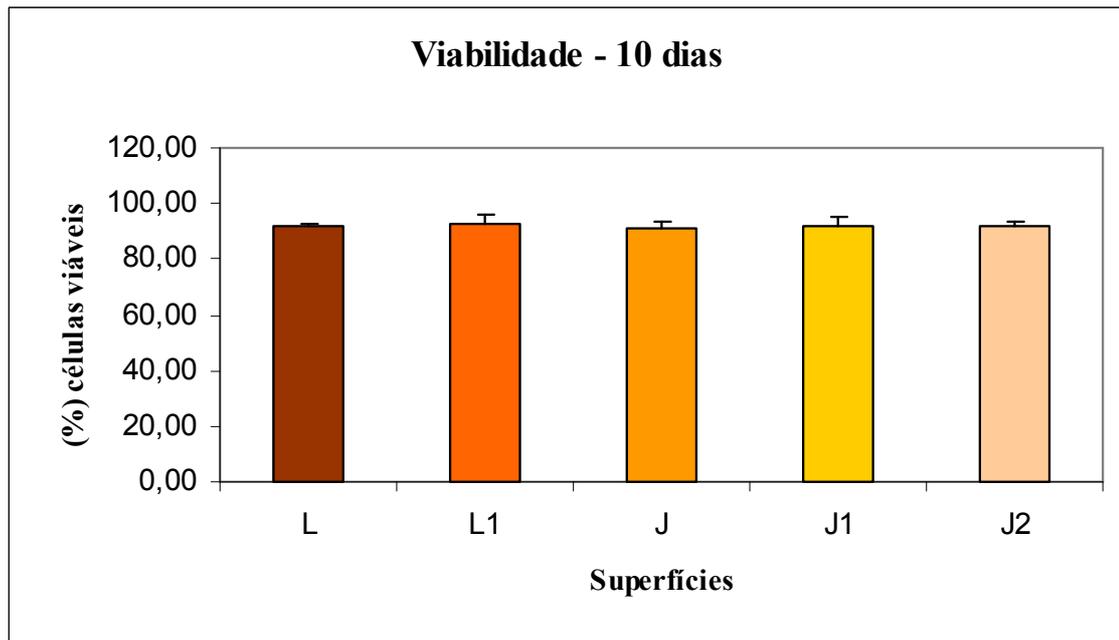


Figura 9. Média (e DP) de células viáveis ($n=4$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($p=0.95$).

Conteúdo de Proteína Total

O conteúdo de proteína total não foi afetado pelas diferentes superfícies de Ti aos 7 dias (ANOVA: $F= 2.83$; $p= 0.06$), 14 dias (ANOVA: $F= 2.83$; $p= 0.06$) e 21 dias (ANOVA: $F= 2.83$; $p= 0.06$). O conteúdo de proteína total também não foi afetado pelo período de cultura (7 dias=14 dias=21 dias; ANOVA - L1: $F= 0.804$, $p= 0.48$, J: $F= 2.73$, $p= 0.12$; J1: $F= 1.42$, $p= 0.29$ e J2: $F= 1.11$, $p= 0.37$), exceto o grupo L, que apresentou um valor médio estatisticamente superior no dia 14, em relação ao dia 21 (7=14 e 14>21, ANOVA: $F= 7.54$, $p= 0.01$). Os dados são apresentados na figura 10.

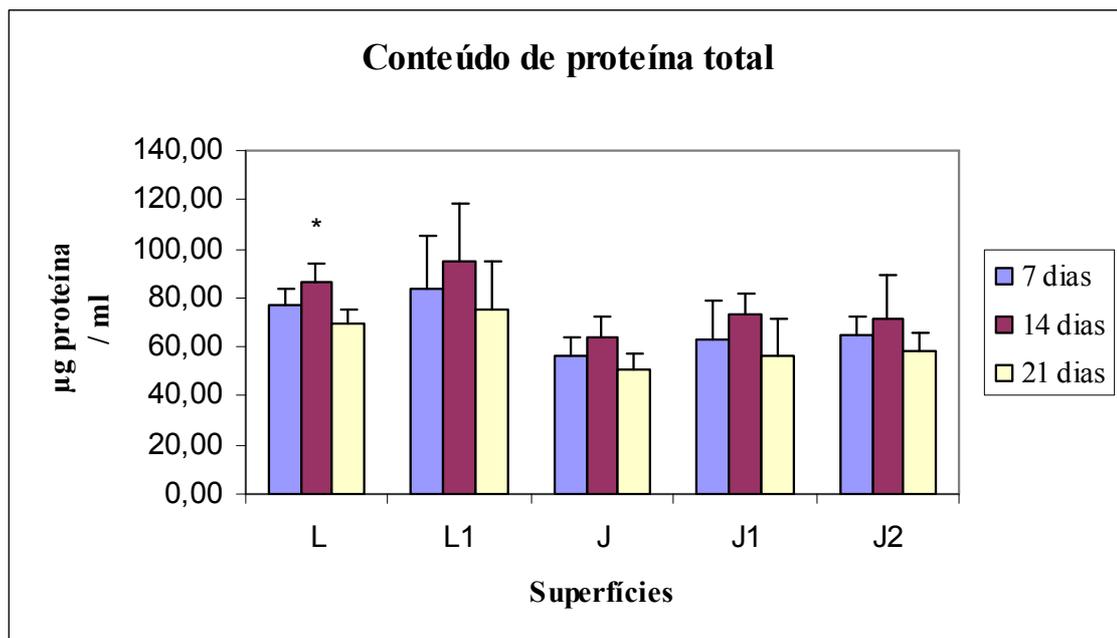


Figura 10. Média (e DP) dos valores do conteúdo de proteína total ($n= 4$). Comparação entre os grupos: diferença não significativa aos 7 ($p= 0.06$), 14 ($p= 0.06$) e 21 dias ($p= 0.06$). Diferentes períodos: diferença estatisticamente significativa em função do tempo no grupo L ($p= 0.01$). *7 dias=14 dias>21 dias.

Atividade de ALP

A atividade de ALP não foi afetada pelas diferentes superfícies de Ti aos 7 dias (ANOVA: $F= 2.10$; $p= 0.13$), 14 dias (ANOVA: $F= 1.61$; $p= 0.22$) e 21 dias (ANOVA: $F= 1.88$, $p= 0.17$). Porém, em todos os grupos houve um aumento significativo dos valores médios desta enzima entre os dias 7 e 14, seguido de uma redução significativa aos 21 dias ($7<14>21$ dias; ANOVA - L: $F= 19.02$, $p= 0.001$; L1: $F= 111.82$, $p< 0.001$; J: $F= 40.03$, $p< 0.001$; J1: $F= 86.76$, $p< 0.001$ e J2: $F= 45.77$, $p< 0.001$). Os dados são apresentados na figura 11.

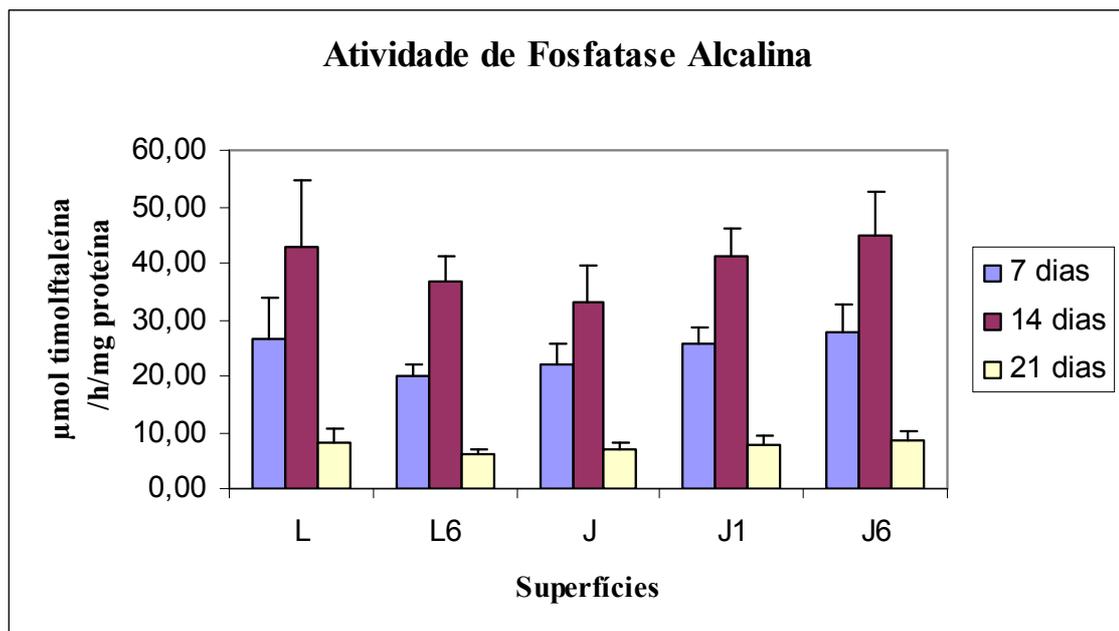


Figura 11. Média (e DP) da atividade de fosfatase alcalina ($n= 4$). Comparação entre os grupos: não foram encontradas diferenças significativas aos 7 ($p= 0.36$), 14 ($p= 0.29$) e 21 dias ($p= 0.24$). Diferentes períodos: diferença estatisticamente significativa em função do tempo em todos os grupos ($p< 0.001$). $7 \text{ dias} < 14 \text{ dias} > 21 \text{ dias}$.

Identificação da matriz mineralizada (MEV/EDS)

Após 21 dias de cultura, a análise qualitativa em MEV mostrou a presença de uma matriz mineralizada e de células nas superfícies L, L1, J, J1 e J2 (figura 12 A, B, C, D e E, respectivamente).

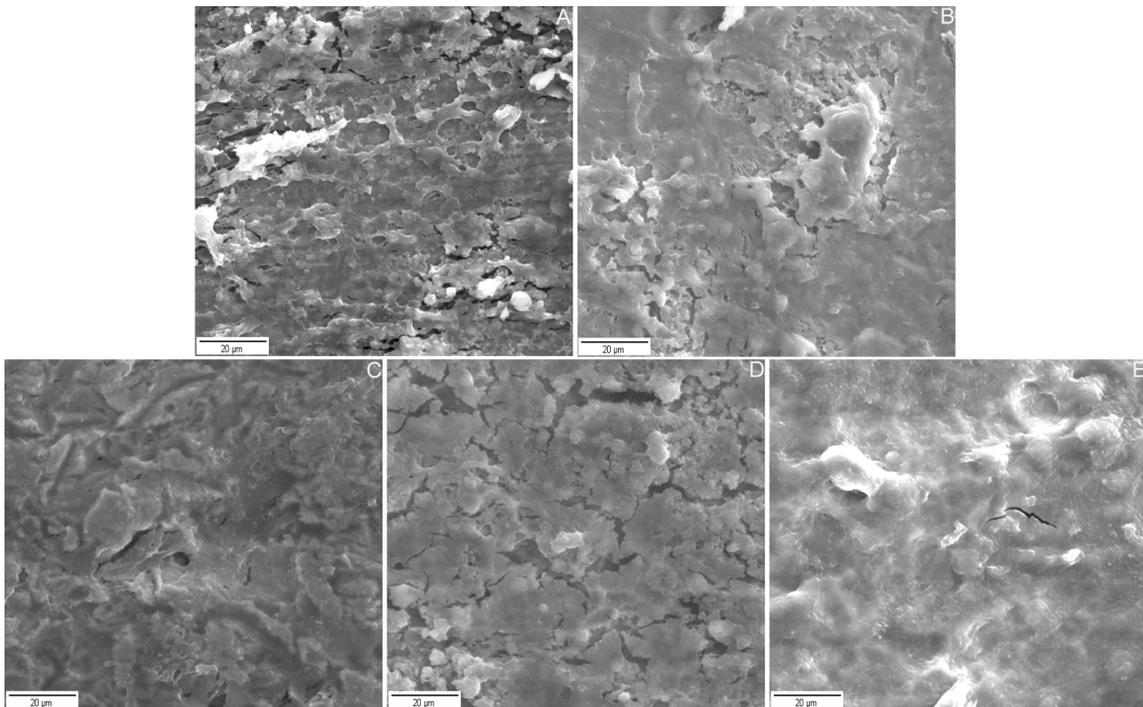


Figura 12. Aspectos micrográficos dos osteoblastos derivados de osso alveolar humano e da matriz mineralizada sobre as superfícies de Ti estudadas. Superfícies: L (A), L1 (B), J (C), J1 (D) e J2 (E). Aumento original: 1000 X, modo SE.

A análise por EDS mostrou claramente a presença dos elementos Ca e P, confirmando a presença de matriz mineralizada em todas as superfícies (L, L1, J, J1 e J2, respectivamente na figura 12A, B, C, D e E). Além disso, pode-se observar a presença do contaminante Al na superfície J (figura 13 C).

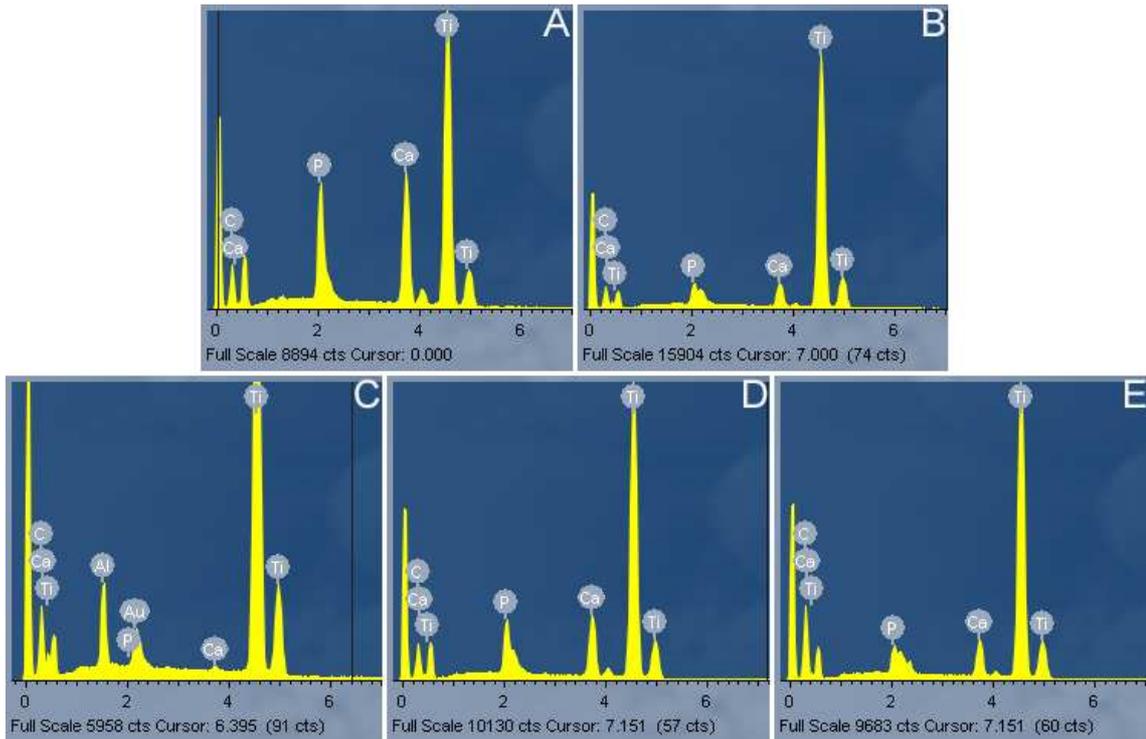


Figura 13. Espectros de EDS das superfícies estudadas aos 21 dias de cultura. Superfícies: L, L1, J, J1 e J2 (A, B, C, D e E, respectivamente). Notar que em todas as superfícies pode-se verificar a presença de Ca e P. Notar também a presença do Al na superfície J (em C).

Quantificação da matriz mineralizada (KS400)

A área média ocupada pela matriz mineralizada pode ser vista na tabela 3. A diferença encontrada entre os grupos foi significativa, após a aplicação do teste ANOVA ($F= 1553.79$, $p < 0.0001$). O grupo J apresentou o menor valor médio enquanto no grupo J2 a área média ocupada pela matriz mineralizada foi significativamente superior aos demais grupos. Os grupos L, L1 e J1 não apresentaram diferenças entre eles.

Tabela 3. Área média (\pm DP) ocupada pela matriz calcificada nas diferentes superfícies.

Grupos	L n= 40	L1 n= 40	J n= 40	J1 n= 40	J2 n= 40
*Área (%)	28.14 (± 5.27)	30.46 (± 9.51)	14.87 (± 9.55)	25.76 (± 5.26)	36.84 (± 7.03)

*Diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.0001$). $J < L = L6 = J1 < J6$.

Na figura 14, pode-se verificar um exemplo do processamento e análise digital, no programa KS400, realizado em uma imagem representativa da superfície J, com menor quantidade de matriz mineralizada (figura 14 A, C e E) e em uma imagem representativa da superfície J2, com o maior percentual de cobertura do Ti (figura 14 B, D e F). Esta análise era repetida em todas as imagens.

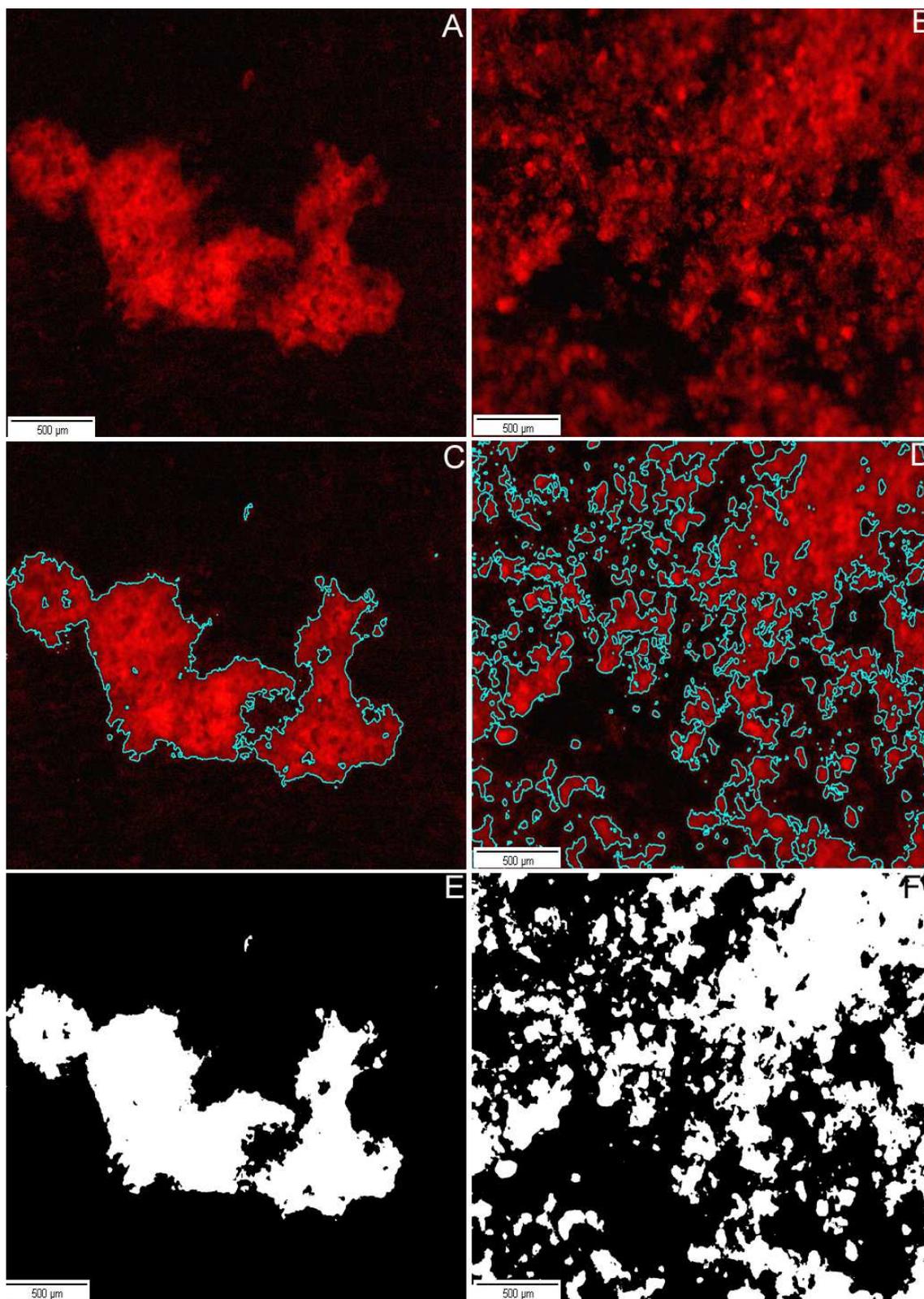


Figura 14. Aspectos micrográficos das superfícies J e J2. Em A e B, imagens iniciais das superfícies com nódulos corados por vermelho de alizarina. Em C e D, identificação das regiões. Em E e F, inversão dos tons (claro/escuro - binarização); imagens prontas para quantificação. Aumento original: 40 X.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, o comportamento de osteoblastos derivados de osso alveolar humano, cultivados sobre superfícies de Ti com rugosidades distintas e quantidades variadas de alumina, foi avaliado.

Para promover alterações na topografia de superfícies de Ti, foram realizados tratamentos mecânicos e químicos, pois o processo de interação osso-implante pode ser influenciado por diferentes materiais, desenhos e características superficiais⁸¹. O lixamento foi realizado para remover as imperfeições presentes nas amostras usinadas (figuras 1A e 2A), e desta forma promover uma padronização destas superfícies; com frequência são encontrados riscos e outras imperfeições nestas superfícies, em decorrência do processo de usinagem, que poderiam afetar os resultados²⁴. A superfície lixada foi usada como controle. Posteriormente, foi realizado um segundo tratamento mecânico: jateamento com alumina, para produzir uma superfície rugosa. Foram usados grãos de alumina de 65 μm , pois segundo ELLINGSEN²⁸ uma superfície “ótima” pode ser criada com jateamento com partículas de 25 a 75 μm . WENNERBERG, ALBREKTSSON e LAUSMAA⁸⁵, comparando implantes jateados com partículas destes dois tamanhos, encontraram melhores resultados, “in vivo”, quando usaram partículas de 75 μm . No final, ambas as superfícies, lixadas e jateadas, recebiam um tratamento químico com HF a 4% realizado em duas etapas. As superfícies inicialmente eram tratadas pelo HF a 4% por 13 ou 60 s, e logo após eram colocadas em uma outra solução contendo HF a 4% mais H_2O_2 a 8%, por 15 s. Segundo KAWAHARA⁴², a utilização do H_2O_2 promove a obtenção de superfícies mais estáveis, através da imediata oxidação dos sítios expostos na superfície do Ti após o ataque pelo HF.

Depois da realização dos diferentes tratamentos, as amostras de Ti foram submetidas a procedimentos de caracterização superficial. Imagens, em MEV, mostraram que o processo de lixamento resultou em riscos com uma direção predominante (figuras 1B e 2B), o que, segundo WENNERBERG et al.⁸⁶, caracteriza uma superfície isotrópica. Já o jateamento com alumina resultou em uma superfície bastante irregular, com gumes evidentes por toda sua extensão, embora sem uma direção predominante (anisotrópica) (figuras 1D e 2D). Observou-se que a aplicação do HF a 4% por 60 s aumentou significativamente a rugosidade da superfície lixada (figuras 2C e 3C) e removeu seus riscos (tabela 1). Portanto, o tratamento com ácido tornou as superfícies anisotrópicas. Já a aplicação deste ácido por 13 ou 60 s, nas superfícies jateadas, não afetou a rugosidade (tabela 1), porém removeu seus gumes e tornou-as mais regulares (figuras 1E e F e 2E e F). Segundo DINIZ²⁴ e DINIZ et al.²⁶, essas características foram responsáveis pela melhor performance das superfícies jateadas e tratadas com HF a 4% na produção de matriz mineralizada. A rugosidade de três superfícies (J, J1 e J2) ficou, em média, em torno de 1 μm , valor que parece favorecer a resposta celular^{24, 26}. As demais superfícies, L e L1, apresentaram rugosidades significativamente mais baixas (valores médios de 0.25 e 0.52, respectivamente. Tabela 1).

Além de modificar a superfície e aumentar sua rugosidade, sabe-se que o jateamento com alumina promove uma contaminação superficial. DARVELL et al.²³ verificaram que o Al detectado na superfície de Ti era originário do processo de jateamento com alumina. Segundo WENNERBERG et al.⁸⁴ tanto o jateamento com alumina como um implante de Ti-6Al-4V podem ser fontes de Al. ANSELME et al.³ verificaram que até mesmo a usinagem realizada em liga de titânio (Ti-6Al-4V) produzia uma camada superficial enriquecida de Al. Quando esta liga era jateada com alumina, a camada da superfície tornava-se mais espessa e enriquecida com este abrasivo. Como a presença da alumina pode ter efeitos teciduais deletérios²⁹, foi também objetivo do presente trabalho identificá-la e quantificá-la. A

identificação foi possível pelo EDS, que detectou o Al apenas nas superfícies J e J1 (figura 4A e B, respectivamente). A quantificação foi realizada com o auxílio do programa KS400. Estudos recentes têm usado com sucesso este método^{22, 25, 59}. As medidas baseiam-se na mensuração dos pixels que compõem regiões distintas presentes em uma imagem. Dois processos são fundamentais na utilização deste programa: o processamento, que no final gera uma imagem binária, e a análise da imagem que produz dados numéricos⁵⁵. Estabeleceu-se como parâmetro principal, no processamento da imagem, a identificação de regiões acima de 15 pixels, pois abaixo desse valor eram nitidamente incluídas sombras decorrentes da topografia superficial (dados não apresentados). Observou-se que o tratamento mecânico com alumina promoveu uma contaminação com este abrasivo (figuras 3A e 5A), que ocupou 9.72% (± 0.5) da área superficial das amostras (figura 5E e tabela 2). O HF a 4%, quando aplicado por 13 s, foi capaz de remover de maneira significativa este contaminante da superfície jateada, porém a eliminação dos resíduos só ocorreu quando este ácido foi aplicado por 60 segundos (figura 3C), conforme também observado em EDS (figura 4C).

Após a caracterização, todas as amostras passaram por uma limpeza metalográfica, pois resíduos superficiais, como óleos lubrificantes e graxas, podem ser citotóxicos¹⁷. As superfícies de Ti, após terem sido esterilizadas em autoclave, foram utilizadas para o cultivo de osteoblastos primários derivados de osso alveolar humano, visando estudar os efeitos das diferentes topografias e composições químicas superficiais no comportamento destas células. Segundo COOPER et al.²¹, a cultura de células fornece informações em nível molecular e celular que podem trazer melhorias no desenho de implantes e nos materiais usados em implantodontia. Foram usadas culturas em primeira passagem, pois o fenótipo do osteoblasto pode ficar alterado após várias subculturas⁷⁵. Além disso, optou-se pelo uso de células de cavidade bucal, porque osteoblastos de diferentes espécies animais e de diferentes localizações no corpo apresentam fenótipos distintos^{41, 54}. A eficácia da técnica para extração

e cultivo de células de osso alveolar humano, empregada no presente trabalho, foi comprovada em estudo anterior⁹. A caracterização através da análise morfológica e do estudo da atividade de fosfatase alcalina, conteúdo de proteína total e principalmente a produção de matriz mineralizada, comprovou o comportamento fenotípico de célula osteoblástica⁹.

De maneira geral, os resultados do presente estudo mostraram que os osteoblastos derivados de osso alveolar humano foram capazes de aderir, proliferar e se diferenciar em todas as superfícies estudadas. Portanto, as diferentes características superficiais do Ti não pareceram afetar o comportamento destas células, contrariando alguns estudos. KIESWETTER et al.⁴⁵ verificaram que a produção de PGE-2 e TGF beta 1 foi maior nas superfícies rugosas. SCHNEIDER et al.⁷⁷ observaram que a expressão gênica dos osteoblastos foi afetada pela maior rugosidade, pois nestas superfícies as células produziram maior quantidade de Cbfa1 e BSPDL. Deve-se destacar, porém, que estudos “in vivo”, que possuem maior relevância clínica que os estudos “in vitro”², têm demonstrado altos índices de sucesso, em longo prazo, com a utilização de implantes de Ti rosqueáveis, independente da rugosidade superficial^{1, 5, 15, 60}. Implantes com superfícies rugosas, que permitem a obtenção de um contato osso implante maior^{14, 16, 19, 20, 33, 46, 85}, podem ser especialmente vantajosos em situações desfavoráveis, como em osso de baixa qualidade e com volume insuficiente^{18, 49}.

A adesão celular não foi influenciada pelas variações de rugosidade nas diferentes superfícies de Ti (figura 7), fato que confirma estudos anteriores^{24, 62, 73, 87}. Os achados de alguns autores contrários a esses resultados provavelmente devem-se ao uso de células de animais¹² ou de linhagens, como MG63 ou MC3T3-E1^{43, 58, 64}, o que dificulta qualquer comparação com o presente trabalho onde foram utilizadas células de cultura primária com origem em fragmentos de osso alveolar. LAUER et al.⁴⁷ também não observaram diferenças no comportamento de osteoblastos derivados de osso maxilar humano cultivados sobre superfícies de Ti com diferentes rugosidades.

A proliferação celular também não foi afetada pelas diferentes características superficiais do Ti (figura 8), confirmando estudos anteriores^{6, 76, 87}, embora alguns estudos tenham mostrado maior proliferação celular em superfícies lisas^{5, 67, 73}, enquanto outros verificaram maior proliferação em superfícies rugosas^{4, 62, 86}. Estes resultados contraditórios talvez possam ser explicados pelas variações encontradas nos diferentes trabalhos já discutidas anteriormente. Outro fato que merece destaque é que a presença de alumina não afetou a adesão e a proliferação celular, pois não foram encontradas diferenças entre as superfícies J e J1, e a as demais, contrariando estudos anteriores^{8, 44}. LOHMANN et al.⁵¹, por exemplo, encontraram menor proliferação e atividade de fosfatase alcalina em células MG63 cultivadas na presença de alumina do que com óxido de zircônio.

A possibilidade de a alumina ser citotóxica aos osteoblastos também foi avaliada. Porém, o estudo da viabilidade celular aos 10 dias (figura 9), descartou esta possibilidade, confirmando achado de estudo anterior⁴⁰, mas contrariando outros estudos. Segundo BELLOWS et al.⁸, o Al mostrou-se citotóxico de maneira dose-dependente, em longo prazo. A alumina, utilizada como material cerâmico em odontologia (In Ceram), apresentou alta toxicidade à linhagem de osteoblasto⁷. ROSA e BELOTI⁷⁴, ao estudarem a resposta de células da medula de ratos cultivadas sobre Ti cp ou sobre uma liga de Ti com rugosidades semelhantes, encontraram uma melhor resposta biológica no primeiro, indicando um possível efeito citotóxico da liga de titânio, que pode ter liberado alumínio e/ou vanádio. As diferenças encontradas entre o presente trabalho e os demais talvez se devam a quantidade de alumina presente nos diferentes estudos, assim como a aplicação de metodologias e células distintas, pois BORDJI et al.¹⁰, ao estudarem o comportamento de osteoblastos humanos cultivados sobre liga de titânio (Ti-6Al-4V), também não encontraram efeitos citotóxicos.

O conteúdo de proteína total foi estudado aos 7, 14 e 21 dias (figura 10). Os resultados mostraram que os valores médios não foram afetados pelas diferentes características

superficiais e quantidades de alumina, descartando, em princípio, um efeito deletério da presença da alumina no metabolismo dos osteoblastos derivados de osso alveolar humano, o que confirma estudo de JOSSET et al.⁴⁰ que verificou que a alumina não afetou negativamente a proliferação e produção de proteína total pelos osteoblastos humanos.

A atividade de ALP foi estudada pela liberação de timolftaleína, que tem cor azul em meio alcalino como resultado da hidrólise do monofosfato de timolftaleína por esta enzima. Segundo o fabricante do kit comercial (Labtest Diagnostica SA, MG, Brasil), a cor formada é diretamente proporcional à atividade enzimática. A presença de alumina nas superfícies J e J1 não impediu que elas tivessem uma atividade de ALP semelhante as demais superfícies, em todos os períodos estudados (figura 11), confirmando achados anteriores^{8, 37, 76}. Este resultado também parece indicar que uma variação de rugosidade, dentro dos limites estabelecidos no presente trabalho, não favorece a atividade desta enzima, o que não está em concordância com alguns estudos. BOYAN et al.¹³ mostraram que a superfície rugosa do implante pode influenciar a célula a se diferenciar precocemente e iniciar a produção de matriz extracelular. POSTIGLIONE et al.⁶⁷ encontraram uma atividade maior da fosfatase alcalina em linhagem de osteoblastos humanos (SaOS-2) cultivada sobre superfícies rugosas. Porém, STANFORD et al.⁸⁰ encontraram uma maior atividade de fosfatase alcalina nas superfícies polidas e XAVIER et al.⁸⁷ observaram um favorecimento da diferenciação osteoblástica em superfícies lisas. Como ambos os trabalhos foram realizados com osteoblastos originários de ratos, pode-se especular que estas células apresentem um comportamento diferente das células humanas. MARTIN et al.⁵⁸ e SCHWARTZ et al.⁷⁸ também encontraram uma atividade menor de fosfatase alcalina com o aumento da rugosidade. Como os autores trabalharam com células de linhagem (MG63) e condrócitos, fica a dúvida também com relação a um possível comportamento distinto entre osteoblastos primários, linhagens de osteoblastos e outras células, como condrócitos, ou se as dificuldades na comparação dos resultados existem pela

enorme variação nas condições de cultura e nas topografias superficiais avaliadas nos diferentes trabalhos⁶. É importante registrar que houve um aumento significativo na atividade de ALP, em todos os grupos, entre os dias 7 e 14, seguida de uma redução significativa aos 21 dias (figura 10). Isto mostra que esta enzima é realmente um marcador precoce da diferenciação dos osteoblastos^{27, 52}.

Estudos “in vitro” e “in vivo” demonstraram que a presença de partículas estranhas pode ativar células que, sensibilizadas, produzem fatores mediadores de reabsorção óssea^{36, 56}. Sabe-se que este fenômeno é mediado por atividade osteoclástica. Porém, os osteoclastos são fortemente regulados pelos osteoblastos⁷⁹. Partículas residuais podem ser fagocitadas diretamente por células clásticas e iniciar uma inflamação ou um processo de reabsorção óssea, ou podem afetar a função dos osteoblastos, alterando a produção de citocinas e outros fatores^{52, 79}. VERMES et al.⁸³ mostraram que a presença de partículas de tamanho reduzido (menos de 3 µm), incluindo Ti e ligas de Ti em meio de cultura, promove a redução da proliferação celular e o aumento da produção de interleucina (IL)- 6. O fato de no presente estudo as partículas de alumina terem apresentado dimensões acima desse valor (em torno de 11 µm, tabela 2), pode explicar os resultados encontrados.

A mineralização da matriz extracelular foi avaliada aos 21 dias de cultura. Foram identificadas regiões mineralizadas em todas as superfícies (figura 12), em imagens de MEV, e confirmados posteriormente pela análise em EDS (figura 13). Porém, em imagens de fluorescência, observou-se que a mineralização, detectada pelo vermelho de alizarina, foi inferior na superfície apenas jateada (figura 14A), enquanto a superfície J2 apresentou a maior área de matriz mineralizada entre todas as superfícies estudadas (figura 14B). Os achados nas superfícies J e J2 não parecem estar relacionados com variações na rugosidade, pois estas superfícies apresentaram níveis de rugosidade semelhantes (1.00 vs 0.99, respectivamente – tabela 1). A superfície J2, por ter uma topografia mais homogênea, pode ter favorecido a

produção de matriz, fato que está em concordância com estudos prévios de DINIZ^{24, 26}. Por outro lado, a presença do contaminante em J pode explicar a performance inferior desta superfície, confirmando achados de BELLOWS et al.⁸, IKEDA et al.³⁷ e THOMPSON e PULEO⁸², que verificaram que a adição de Al no meio de cultura reduzia a presença de Ca na matriz, de maneira dose-dependente. LINCKS et al.⁵⁰ compararam Ti cp e ligas de titânio e encontraram melhores resultados com o primeiro, quando este apresentava uma superfície rugosa.

Embora vários mecanismos tenham sido propostos, nenhum fenômeno isolado pode explicar os efeitos deletérios do Al. Especula-se que o Ca é perdido por uma combinação de reabsorção mediada por células e dissolução físico-química pelo efluxo de íons da superfície óssea induzido pelo Al³⁸. Outra explicação pode ser a interferência deste elemento na formação do osteóide (matriz não mineralizada com predomínio de colágeno), fato observado na osteomalacia. Após a síntese e liberação de moléculas orgânicas, pelos osteoblastos, o osteóide é formado com a função de agir como um arcabouço para a deposição de apatita mineral⁷⁹. O Al poderia afetar a formação óssea pela supressão da síntese da matriz³², ou pelo aumento do volume do osteóide, que acarretaria na diminuição da formação óssea^{71, 72}. Em bebês prematuros, o Al reduziu o conteúdo e a densidade mineral óssea¹¹. Resíduos de contaminantes também podem iniciar uma resposta inflamatória que, por sua vez, pode levar a uma menor formação óssea^{71, 72}. THOMPSON e PULEO⁸² sugeriram que íons derivados de uma liga de titânio (Ti-6Al-4V) podem afetar a formação óssea pela inibição da expressão fenotípica de células da medula óssea.

No presente trabalho, pôde-se observar que o comportamento dos osteoblastos não foi afetado pelos diferentes tratamentos de superfície de Ti, nem pelas quantidades variadas de alumina. Porém, a formação de matriz mineralizada pode ter sido prejudicada pela presença de alumina em maior quantidade na superfície J. Esta afirmação não está em concordância

com trabalho de LEWANDOWSKA-SMUMIEL e KOMENDER⁴⁸ que verificou que a alumina é bem tolerada pelos tecidos ósseos. Porém, estes autores enfatizaram a importância de mais estudos longitudinais. MULLER et al.⁶¹ mostraram resultados superiores na osseointegração aos 7 e 28 dias com o uso de implantes jateados com alumina, provavelmente, segundo os autores, pela maior rugosidade dos mesmos. Já PIATTELLI et al.⁶⁶ não encontraram diferenças entre superfícies contendo ou não resíduos de alumina no contato osso-implante. Como todos estes trabalhos são estudos “in vivo” realizados em animais, torna-se difícil qualquer comparação com o presente trabalho. JOHANSSON et al.³⁹ compararam Ti cp e liga de Ti (Ti-6Al-4V) e verificaram que as superfícies usinadas de Ti cp promoviam uma maior estabilidade nos implantes que a liga contendo Al. Este achado foi confirmado por HAN et al.³⁵ que realizaram estudo “in vivo”, em coelhos, e observaram melhores resultados usando Ti cp do que a liga com Al. GUIZZARDI et al.³⁴ ao estudarem diferentes tratamentos superficiais e o comportamento de osteoblastos humanos, encontraram melhores resultados usando óxido de zircônio do que alumina, apesar da faixa de rugosidade das superfícies ser bastante próxima. Porém, SADER et al.⁷⁶ não encontraram efeito citotóxico da alumina sobre osteoblastos “in vitro”. É importante salientar que os autores não quantificaram este contaminante. Além disso, utilizaram células de fêmur de camundongos e não estudaram a formação de matriz mineralizada. Portanto, mais estudos com células humanas podem ser necessários para estabelecer o verdadeiro papel da alumina na expressão fenotípica destas células.

Sabe-se que ainda que traços de metais sejam considerados essenciais para a saúde, eles também podem ser tóxicos e causar reações inflamatórias⁶⁸. Enquanto estudos especificamente direcionados para a verificação dos efeitos deletérios da alumina na perda de implantes não se encontram disponíveis, pode ser uma medida de precaução a aplicação de HF a 4% por 60 s nas superfícies jateadas pela alumina. Este procedimento elimina o

contaminante, conforme mostrado no presente trabalho, mantendo uma rugosidade suficiente para a osseointegração, com características topográficas que parecem favorecer significativamente o comportamento dos osteoblastos de osso alveolar humano, como verificado na superfície J2.

Porém, deve-se lembrar que, ainda que superfícies rugosas pareçam ser preferíveis às lisas²⁴, de maneira geral as diferenças encontradas em diversos estudos “in vivo” parecem ser significativas apenas em situações específicas¹⁸, ou quando se almeja um tempo mais curto de reparação tecidual⁴⁹. Quando os implantes são analisados criticamente, apenas o parafuso original de BRANEMARK apresenta documentação suficiente². Por outro lado, vale lembrar que dentre os fatores biológicos que contribuem para as falhas na osseointegração, aparece com destaque à contaminação microbiana. Sabe-se que as alterações na topografia superficial de implantes tornam a superfície mais suscetível à formação bacteriana, podendo levar a falhas no implante²⁹. Além disso, uma “periimplantite” uma vez instalada, é obviamente muito mais difícil de ser tratada em superfícies rugosas. Portanto, superfícies lisas não podem (nem devem) ser descartadas na utilização de rotina na implantodontia.

7. CONCLUSÕES

Dentro das limitações deste estudo, pode-se concluir que:

1. Os diferentes tratamentos mecânicos e/ou químicos promoveram alterações na topografia superficial do titânio, resultando em rugosidades distintas.
2. O estudo da composição química superficial mostrou a presença de alumina em duas superfícies, apenas jateada (J) e jateada e atacada por HF a 4% por 13 segundos (J1). A aplicação do HF a 4% por 60 s (J2) removeu todo o contaminante da superfície jateada por alumina.
3. A adesão, proliferação e diferenciação dos osteoblastos derivados de osso alveolar humano não foram afetadas pelas diferentes rugosidades e quantidades de alumina. Porém, a presença de alumina em maior quantidade, na superfície J, parece ter reduzido a formação de matriz mineralizada. Como esta superfície apresentou níveis de rugosidade semelhantes a outras 2 (J1 e J2), estes resultados podem indicar um efeito deletério da presença deste contaminante na formação óssea.

REFERÊNCIAS

1. ADELL, R.; LEKHOLM, U.; ROCKLER, B.; BRANEMARK, P. I.; A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. **Int. J. Oral Surg.**, v. 10, p. 387-416, 1981.
2. ALBREKTSSON, T.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Osseointegração: antecedentes históricos e conceitos atuais. In: LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap. 33, p. 787-798.
3. ANSELME, K.; LINEZ, P.; BIGERELLE, M.; LE MAGUER, D.; LE MAGUER, A.; HARDOUIN, P.; HILDEBRAND, H. F.; IOST, A.; LEROY, J. M. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. **Biomaterials**, v. 21, p. 1567-1577, 2000.
4. ARAÚJO, N. S.; JAEGER, R. G.; TODESCAN, F. F.; JAEGER, M. M. M.; GROLL, W. Cell culture test for assessing attachment and proliferation on titanium dental implants with modified surfaces. **R P G Rev. Pos Grad.**, v. 8, p. 103-9, 2001.
5. BABBUSH, C.; KENT, J.; MISIEK, D. Titanium-plasma-sprayed (TPS) screw implants for the reconstruction of the edentulous mandible. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 44, p. 274-282, 1986.
6. BACHLE, M; KOHAL, R. J. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG-63 cells. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 15, p. 683-692, 2004.
7. BAGAMBISA, F. B.; KAPPERT, H. F.; SCHILLI, W. Interfacial reactions of osteoblasts to dental and implant materials. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 52, p. 52-56, 1994.
8. BELLOWS, C. G.; HEERSCHE, J. N. M.; AUBIN, J. E. Aluminum accelerates osteoblastic differentiation but is cytotoxic in long-term rat calvaria cell cultures. **Calcif. Tissue Int.**, v. 65, p. 59-65, 1999.
9. BELOTI, M. M.; OLIVEIRA, P. T.; GIMENES, R.; ZAGHETE, M. A.; BERTOLINI, M. J.; ROSA, A. L. In vitro biocompatibility of a novel membrane of the composite poly (vinylidene-trifluoroethylene) barium titanate. **J. Biomed Mat. Res.** In press.
10. BORDJI, K.; JOUZEAU, J. Y.; MAINARD, D.; PAYAN, E.; NETTER, P.; RIE, K. T.; STUCKY, T.; HAGE-ALI, M. Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts. **Biomaterials**, v. 17, p. 929-940, 1996.

11. BOUGLÉ, D.; SABATIER, J. P.; BUREAU, F.; LAROCHE, D.; BROUARD, J.; GUILLOIS, B.; DUHAMEL, J. F. Relationship between bone mineralization and aluminum in the healthy infant. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 52, p. 431-435, 1998.
12. BOWERS, K. T.; KELLER, J. C.; RANDOLPH, B. A.; WICK, D. G.; MICHAELS, C. M. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 7, p. 302-10, 1992.
13. BOYAN, B. D.; HUMMERT, T. W.; DEAN, D. D.; SCHWARTZ, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. **Biomaterials**, v. 17, p. 137-146, 1996.
14. BRUNETTE, D. M. The effects of implant surface topography on the behavior of cells. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 3, p. 231-246, 1988.
15. BUSER, D.; WEBER, H. P.; LANG, N. P. Tissue integration of non-submerged implants. 1 year results of prospective study with 100 ITI hollow-cylinder and hollow-screw implants. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 1, p. 33-40, 1990.
16. CARLSSON, L.; ROSTLUND, T.; ALBREKTSSON, B.; ALBREKTSSON, T. Removal torques for polished and rough titanium implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 3, p. 21-24, 1988.
17. CASSINELLI, C.; MORRA, M.; BRUZZONE, G.; CARPI, A.; DI SANTI, G.; GIARDINO, R.; FINI, M. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 2. In vitro experiments. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 18, p. 46-52, 2003.
18. COCHRAN, D. L. A comparison of endosseous dental implant surfaces. **J. Periodontol.**, v. 70, p. 1523-1539, 1999.
19. COCHRAN, D. L.; NUMMIKOSKI, P. V.; HIGGINBOTTOM, F.; HERMANN, J. S.; MAKINS, S. R.; BUSER, D. Evaluation of an endosseous titanium implant with a sandblasted and acid-etched surface in the canine mandible: radiographic results. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 7, p. 240-252, 1996.
20. COCHRAN, D. L.; SCHENK, R.; LUSSI, A. HIGGINBOTTOM, F.; BUSER, D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 40, p. 1-11, 1998.
21. COOPER, L. F.; MASUDA, T.; YLIHEIKKILÄ, P. K.; FELTON, D. A. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 13, p. 163-174, 1998.
22. CURUNTU, I-D. Highly effective techniques in computerized dental tissue morphometry. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 6, p. 631-642, 2002.
23. DARVELL, B. W.; SAMMAN, N.; LUK, W. K.; CLARK, R. K. F.; TIDERMAN, H. Contamination of titanium castings by aluminum oxide blasting. **J. Dent.** V. 23, p. 319-322, 1995.

24. DINIZ, M. G. **Influência de tratamentos superficiais sobre chapas de titânio na osteogênese em culturas de células com origem na medula óssea**. 2001. 109p. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Orientadores: Prof. Dr. Glória de Almeida Soares e Prof. Dr. Maria Helena Raposo Fernandes.
25. DINIZ, M. G.; PINHEIRO, M. A. S.; ANDRADE Jr., A. C. C.; FISCHER, R. G. Characterization of titanium surfaces for dental implants with inorganic contaminant. **Braz. Oral Res.**, v. 19, p. 106-111, 2005.
26. DINIZ, M. G.; SOARES, G. A.; COELHO, M. J.; FERNANDES, M. H. Surface topography modulates the osteogenesis in human bone marrow cell cultures grown on titanium samples prepared by a combination of mechanical and acid treatments. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 13, p. 421-432, 2002.
27. DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v. 289, p. 1501-1505, 2000.
28. ELLINGSEN, J. E. Surface configurations of dental implants. **Periodontol.** 2000, v. 17, p. 36-46, 1998.
29. ESPOSITO, M.; HIRSCH, J. M.; LEKHOLM, U.; THOMSEN, P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants (II). Etiopathogenesis. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 106, p. 721-764, 1998,
30. FLATEN, T. P.; ALFREY, A. C.; BIRCHALL, J. D.; SAVORY, J.; YOKEL, R. A. Status and future concerns of clinical and environmental aluminum toxicology. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 48, p. 527-541, 1996.
31. FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells**. 2. ed. New York: Wiley Liss, 2000.
32. GOODMAN, W. G. Short-term aluminum administration in the rat: reductions in bone formation without osteomalacia. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 103, p. 749-757, 1984.
33. GOTFREDSEN, K.; NIMB, L.; HJORTING-HANSEN, E.; JENSEN, J. S.; HOLMEN, A. 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.
34. GUIZZARDI, S.; GALLI, C.; MARTINI, D.; BELLETTI, S.; TINTI, A.; RASPANTI, M.; TADDEI, P.; RUGGERI, A.; SCANDROGLIO, R. Different titanium surface treatment influences human mandibular osteoblast response. **J. Periodontol.**, v. 75, p. 273-282, 2004.
35. HAN, C-H.; JOHANSSON, C. B.; WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Quantitative and qualitative investigations of surface enlarged titanium and titanium alloy implants. **Clin. Oral. Impl. Res.**, v. 9, p. 1-10, 1998.
36. HAYNES, D. R.; ROGERS, S. D.; HAY, S.; PEARCY, M. J.; HOWIE, D. W. The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles. **J. Bone Joint Surg.**, v. 75-A, p. 825-834, 1993.

37. IKEDA, K.; MATSUMOTO, T.; MORITA, K.; KUROKAWA, K.; OGATA, E. Inhibition of in vitro mineralization by aluminum in a clonal osteoblastic cell line, MC3T3-E1. **Calcif. Tissue Int.**, v. 39, p. 319-323, 1986.
38. JEFFERY, E. H.; ABREO, K.; BURGESS, E.; CANNATA, J.; GREGER, J. L. Systemic aluminum toxicity: effects on bone, hematopoietic tissue and kidney. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 48, p. 649-665, 1996.
39. JOHANSSON, C. B.; HAN, C. H.; WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. A quantitative comparison of machined commercially pure titanium and titanium-aluminum-vanadium implants in rabbit bone. **J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 13, p. 315-321, 1998.
40. JOSSET, Y.; OUM'HAMED, Z.; ZARRINPOUR, A.; LORENZATO, M.; ADNET, J. J.; LAURENT-MAQUIN, D. In vitro reactions of human osteoblasts in culture with zirconia and alumina ceramics. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 47, p. 481-493, 1999.
41. KASPERK, C.; WERGEDAL, J.; STRONG, D.; FARLEY, J.; WANGERIN, K.; GROPP, H.; ZIEGLER, R.; BAYLINK, D. J. Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 80, p. 2511-2517, 1995.
42. KAWAHARA, H. Biomaterials for dental implants. In: WISE, D. L. (ed.). **Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering**. v. 2, p. 1469-1524, 1995.
43. KELLER, J. C.; SCHNEIDER, G. B.; STANFORD, C. M.; KELLOGG, B. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. **Implant. Dent.**, v. 12, p. 175-181, 2003.
44. KIDDER, L. S.; KLEIN, G. L.; GUNDBERG, C. M.; SEITZ, P. K.; RUBIN, N. H.; SIMMONS, D. J. Effects of aluminum on rat bone cell populations. **Calcif. Tissue Int.**, v. 53, p. 357-361, 1993.
45. KIESWETTER, K.; SCHWARTZ, Z.; HUMMERT T. W.; COCHRAN, D. L.; SIMPSON, J.; DEAN, D. D.; BOYAN, B. D. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG 63 cells. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 32, p. 55-63, 1996.
46. LARSSON, C.; THOMSEN, P.; ARONSSON, B. O.; RODAHL, M.; LAUSMAA, J.; KASEMO, B.; ERICSON, L. E. Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and eletropolished implants with different oxide thicknesses. **Biomaterials**, v. 17, p. 605-616, 1996.
47. LAUER, G.; WIEDMANN-AL-AHMAD, M.; OTTEN, J. E.; HUBNER, U.; SCHMELZEISEN, R.; SCHILLI. The titanium surface texture effects adherence and growth of human gingival keratinocytes and human maxillar osteoblast-like cells in vitro. **Biomaterials**, v. 22, p. 2799-2809, 2001.
48. LEWANDOWSKA-SZUMIEL, M.; KOMENDER, J. Aluminium release as a new factor in the estimation of alumina bioceramic implants. **Clin. Mater.**, v. 5, p. 167-175, 1990.

49. LIMA, L. A. P. A. **Reparação dos tecidos periimplantares após colocação de implantes de titânio, de superfície lisa ou de plasma de titânio, simultânea à regeneração óssea guiada. Estudo histológico e histométrico em cães.** 1999. 83p. Tese (Livre-Docência em Periodontia). Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
50. LINCKS, J.; BOYAN, B. D.; BLANCHARD, C. R.; LOHMANN, C. H.; LIU, Y.; COCHRAN, D. L.; DEAN, D. D. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. **Biomaterials**, v. 19, p. 2219-2232, 1998.
51. LOHMANN, C. H.; DEAN, D. D.; KOSTER, G.; CASASOLA, D.; BUCHHORN, G. H.; FINK, U; SCHWARTZ, Z; BOYAN, B. D. Ceramic and PMMA particles differentially affect osteoblast phenotype. **Biomaterials**, v. 23, p. 1855-1863, 2002.
52. LONG, M. W. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 27, p. 677-690, 2001.
53. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. R.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
54. MAILHOT, J. M.; BORKE, J. L. An isolation and in vitro culturing method for human intraoral bone cells derived from dental implant preparation sites. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 9, p. 43-50, 1998.
55. MALKUSCH, W. Fundamentals and problem-solving: sequences of quantitative image analysis. **Laboratory focus**, v. 4, p. 15-17, 2000.
56. MALONEY, W. J.; SMITH, R. L. Periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty: the role of particulate wear debris. **J. Bone Joint Surg.**, v. 77-A, p. 1448-1461, 1995.
57. MANIATOPOULOS, C.; SODEK, J.; MELCHER, A. H. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. **Cell Tissue Res.**, v. 254, p. 317-330, 1988.
58. MARTIN, J.; SCHWARTZ, Z.; HUMMERT, T.; SCHRAUB, D.; SIMPSON, J.; LANKFORD, J.; DEAN, D.; COCHRAN, D.; BOYAN, B. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 29, p. 389-401, 1995.
59. MIRACCO, C.; DE SANTI, M. M.; SCHURFELD, K.; SANTOPIETRO, R.; LALINGA, A. V.; FIMIANI, M.; BIAGIOLI, M.; BROGI, M.; DE FELICE, C.; LUZI, P.; ANDREASSI, L. Quantitative in situ evaluation of telomeres in fluorescence in situ hybridization-processed sections of cutaneous melanocytic lesions and correlation with telomerase activity. **Br. J. Dermatol.**, v. 146, p. 399-408, 2002.
60. MERICSKE-STERN, R.; STEINLIN, S.; SCHAFFNER, T.; MARTI, P.; GEERING, A. H. Peri-implant mucosal aspects of ITI implants supporting overdentures. A five-year longitudinal study. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 5, p. 9-18, 1994.

61. MULLER, W. D.; GROSS, U.; FRITZ, T.; VOIGT, C.; FISCHER, P.; BERGER, G. Evaluation of the interface between bone and titanium surfaces being blasted by aluminum oxide or bioceramic. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 14, p. 349-356, 2003.
62. MUSTAFA, K.; WENNERBERG, A.; WROBLEWSKI, J.; HULTENBY, K.; LOPEZ, B. S.; ARVIDSON, K. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 12, p. 515-525, 2001.
63. OLIVEIRA, P. T.; ZALZAL S. F.; IRIE, K.; NANCI. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 51, p. 633-641, 2003.
64. ORSINI, G.; ASSENZA, B.; SCARANO, A.; PIATTELLI, M.; PIATTELLI, A. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 15, p. 779-784, 2000.
65. PATTERSON Jr., M. K. Measurement of growth and viability of cells in culture. **Meth. Enzymol.**, v. 58, p. 141-152, 1979.
66. PIATTELLI, A.; DEGIDI, M.; PAOLANTONIO, M.; MANGANO, C.; SCARANO, A. Residual aluminum oxide on the surface of titanium implants has no effect on osseointegration. **Biomaterials**, v. 24, p. 4081-4089, 2003.
67. POSTIGLIONE, L.; DI DOMENICO, G.; RAMAGLIA, L.; MONTAGNANI, S.; SALZANO, S.; DI MEGLIO, F.; SBORDONE, L.; VITALE, M.; ROSSI, G. Behavior of SaOS-2 cells cultured on different titanium surfaces. **J. Dent. Res.**, v. 82, p. 692-696, 2003.
68. PULEO, D. A.; NANCI, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. **Biomaterials**, v. 20, p. 2311-2321, 1999.
69. RATHBUN, W. E. Esterilização e assepsia. In: NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G. **Microbiologia oral e imunologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 345-363.
70. REDDY, G. K.; ENWEMWKA, C. S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clin. Biochem.**, v. 29, p. 225-229, 1996.
71. RODRIGUEZ, M.; FELSENFELD, A. J.; LIACH, F. The evolution of osteomalacia in the rat with acute aluminum toxicity. **J. Bone Miner. Res.**, v. 4, p. 687-696, 1989.
72. _____. Aluminum administration in the rat separately affects the osteoblast and bone mineralization. **J. Bone Miner. Res.**, v. 5, p. 59-67, 1990.
73. ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation and differentiation. **Braz. Dent. J.**, v. 14, p. 16-21, 2003a.
74. _____. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 14, p. 43-48, 2003b.

75. _____. Development of the osteoblast phenotype of serial cell subcultures from human bone marrow. **Braz. Dent. J.**, v. 16, p. 225-230, 2005.
76. SADER, M. S.; BALDUINO, A.; SOARES, G. A.; BOROJEVIC, R. Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation. **Clin. Oral. Impl. Res.**, v. 16, p. 667-675, 2005.
77. SCHNEIDER, G. B.; PERINPANAYAGAM, H.; CLEGG, M.; ZAHARIAS, R.; SEABOLD, D.; KELLER, J.; STANFORD, C. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. **J. Dent. Res.**, v. 82, p. 372-376, 2003.
78. SCHWARTZ, Z.; MARTIN, J.; DEAN, D.; SIMPSON, J.; COCHRAN, D.; BOYAN, B. Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation, depends on the state of cell maturation. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 30, p. 145-155, 1996.
79. SODEK, J.; MCKEE, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontol. 2000**, v. 24, p. 99-126, 2000.
80. STANFORD, C. M.; KELLER, J. C.; SOLURSH, M. Bone cell expression on titanium surfaces is altered by sterilization treatments. **J. Dent. Res.**, v. 73, p. 1061-1071, 1994.
81. SYKARAS, N.; LACOPINO, A. M.; MARKER, V. A.; TRIPLETT, R. G.; WOODY, R. D. Implants materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 15, p. 675-690, 2000.
82. THOMPSON, G. J.; PULEO, D. A. Ti-6Al-4V ion solution inhibition of osteogenic cell phenotype as a function of differentiation time course in vitro. **Biomaterials**, v. 17, p. 1949-1954, 1996.
83. VERMES, C.; CHANDRASEKARAN, R.; JACOBS, J. J.; GALANTE, J. O.; ROEBUCK, K. A.; GLANT, T. T. The effects of particulate wear debris, cytokines, and growth factors on the function of MG-63 osteoblasts. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 83, p. 201-211, 2001.
84. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C.; ANDERSSON, B. Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. **Biomaterials**, v. 17, p. 15-22, 1996a.
85. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T.; LAUSMAA, J. Torque and histomorphometric evaluation of c.p titanium screws blasted with 25- and 75 μ m-sized particles of Al₂O₃. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 30, p. 251-260, 1996b.
86. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T.; LINDHE, J. Topografia da superfície de implantes de titânio. In: LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap. 34, p. 799-806.

87. XAVIER, S. P.; CARVALHO, P. S.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. **J. Dent.**, v. 31, p. 173-180, 2003.

APÊNDICE A – artigo publicado

DINIZ, M. G.; PINHEIRO, M. A. S., ANDRADE JR, A. C. C.; FISCHER, R. G.

Characterization of titanium surfaces for dental implants with inorganic contaminant. **Braz.**

Oral Res., v. 19, p. 106-111, 2005.

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](#)