

SELMA MARIA DE ASSIS

**AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE FIBROBLASTOS L929 SOBRE
SUPERFÍCIES DE TITÂNIO POLIDOS E USINADOS POR MEIO DE
FORÇA CENTRÍFUGA**

SÃO PAULO

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Selma Maria de Assis

**Avaliação da adesão de fibroblastos L929 sobre superfícies de
titânio polidos e usinados por meio força centrífuga**

Dissertação apresentada à Universidade
Ibirapuera, para obter o Título de Mestre, pelo
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
Área de Concentração: Biodontologia
Orientadora: Profa. Dra. Sonia Maria Gaglioti

São Paulo

2008

Assis, SM Avaliação da adesão de fibroblastos L929 sobre superfícies de titânio polidos e usinados por meio de força centrífuga. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Ibirapuera; 2008

São Paulo, 12/03/2008

Banca Examinadora

1.Prof (a). Dr (a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2.Prof (a). Dr (a).: _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3.Prof (a). Dr (a).: _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Jesus Cristo que me ama e me ensinou a não desistir e continuar em frente, independente das circunstâncias e obstáculos que existam em minha vida.

A meu amor Shu, que de maneira especial e companheira que permitiu realizações em minha vida pelas quais sou eternamente grata. Pessoa amada que se manteve ao meu lado, ajudando nos momentos difíceis e tornando-se meu equilíbrio durante todo este período de aprendizado.

Aos meus queridos pais Edgar e Zina que sempre souberam educar seus filhos a quem devo toda a minha formação e caráter, pelo incentivo, gestos de Amor e Carinho sempre tão presente em minha vida de maneira tão incondicional

AGRADECIMENTOS

A Universidade Ibirapuera na pessoa do Reitor Prof .Jorge Bastos, Ph.D.

A Pro-Reitora Prof. Dra. Ana Gracinda que nos apoiou para o êxito deste trabalho.

Ao Coordenador do Curso de Odontologia da Universidade Ibirapuera Prof. Dr. Sigmar de Mello Rode agradeço pela atenção e competência no aprimoramento dos profissionais que o cercam dando direção e dignificando a Odontologia.

Ao Coordenador do Curso de Mestrado em Boodontologia da Universidade Ibirapuera, Prof. Dr. Cláudio Pannuti pela coordenação e apoio .

Ao Prof. Dr. Maurício Rufaiel Matson, e Ana Maria Matson que de maneira extraordinária e competente me conduziram em mais esta etapa de crescimento pessoal e profissional, sendo um diferencial na odontologia tornando-a uma profissão cada vez mais digna.

A Prof. Dra. Sonia Maria Gagiotti que de maneira atenciosa me ajudou na realização deste sonho profissional.

Ao Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra que com sua surpreendente competência e desenvoltura me ajudou a alcançar os avanços científicos que tanto precisava na realização deste trabalho.

In memoriam ao Prof. Dr. Francisco de Assis Tavares da Universidade Federal de Pernambuco, pelo carinho, alegria e profissionalismo, que sempre nortearam a sua vida e em que me espelhei para crescer, perseverar e progredir

A Prof. Miriam Rubio Faria que com capacidade e idealismo criou condições para que existisse o laboratório do mestrado em Boodontologia da Universidade Ibirapuera.

A toda equipe de Professores do Mestrado em Boodontologia da Universidade Ibirapuera, que de forma inteligente e participativa apóia a todos.

A Sandra e Adriana funcionárias do Laboratório de Biodontologia da Universidade Ibirapuera pelos momentos de apoio e suporte nesta minha conquista.

A Elaine e Karla secretárias do Curso de Mestrado Odontologia da Universidade Ibirapuera pelo apoio.

A Lucimara secretária do Curso de Odontologia da Universidade Ibirapuera pelo apoio.

Aos meus colegas de curso que trilham o melhor caminho a busca da capacitação e aperfeiçoamento.

Ao Prof. Nilton De Bortoli pela oportunidade de conhecer a Implantodontia que com sua maneira inteligente e bem-humorada consegue cativar todas as pessoas que o cercam.

Ao Prof. Dr. Nilton De Bortoli Jr, por me incentivar na busca do conhecimento científico.

Ao Prof. Sérgio Oliveira que sempre me mostrou o quanto esmerar-se e ter amor ao trabalho podem proporcionar o sucesso e a realização na vida de uma pessoa.

Ao engenheiro José Ricardo Magnani Fortunato da Empresa Implacil Material Odontológico Ltda que de forma inteligente e comprometida nos deu apoio na realização deste trabalho.

Agradeço a toda equipe da Empresa Implacil Material Odontológico Ltda, especialmente a Tiago, Karina e Ronaldo, pelo apoio e por serem tão competentes e educados.

A Socorro Cunha minha amiga leal que durante estes anos me incentivou a continuar na odontologia e progredir na vida.

A meu amigo Lélío e família Reis pela amizade e apoio que sempre me deram.

A minha amiga Claudia e família pela amizade e carinho de sempre.

As pessoas que me ajudaram de maneira direta e indireta na realização deste trabalho.

Muito obrigada pela Honra de ter feito este Curso de Mestrado, e poder devolver as pessoas o bem que tanto recebi no tempo que convivi com esta Excelente Equipe

“O coração do homem considera o seu caminho, mas o Senhor lhe dirige os passos”

Provérbios 16:9

Assis, SM Avaliação da adesão de fibroblastos L929 sobre superfícies de titânio polidos e usinados por meio de força centrífuga. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Ibirapuera; 2008.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade de um dispositivo para análise da adesão de células, bem como analisar o processo de adesão de fibroblastos L929 cultivados sobre discos de titânio usinados e polidos, por meio de força centrífuga. Vinte discos de titânio, 10 usinados e 10 polidos receberam culturas de fibroblastos L929 por um período de 27 min. Metade dos discos permaneceu em repouso (controle) e a outra metade foi centrifugada a uma força de 600G. As células foram marcadas com um reagente SYBR Gold e contadas em um microscópio de luz invertida. As contagens, realizadas por regiões, foram analisadas pelo teste “t” de Student e ANOVA. Pela análise realizada foi possível verificar a presença de maior quantidade de células antes das centrifugações (110 ± 101 , grupo controle; 30 ± 36 grupo centrifugado). Em uma análise considerando-se o tratamento da superfície de titânio foram verificadas as seguintes médias: $70,9 \pm 88,4$ para o grupo controle usinado; $151,0 \pm 110,1$ para o grupo controle polido; $33,1 \pm 39,1$ para o grupo centrifugado usinado; e $27,6 \pm 38,9$ para o grupo centrifugado polido. As diferenças foram significantes entre os grupos controles e centrifugados, para ambos os discos (usinados e polidos). Desta forma foi possível concluir que o método de avaliação da adesão celular foi eficiente, a superfície de titânio polida permite maior crescimento celular porém com adesão inferior à superfície usinada.

PALAVRAS CHAVE: Adesão celular; Força centrífuga; Fibroblasto L929; titânio.

Assis, SM de. Evaluation of the adhesion of fibroblastos L929 on titanium surfaces polishing and usinados by means of force centrifugal machine. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Ibirapuera; 2008.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effectiveness of a device for analysis of the adhesion of cells, as well as to analyze the process of L929 fibroblasts adhesion cultivated on titanium disks non polished and polished, through centrifugal force. Twenty titanium disks, 10 non polished and 10 polished they received L929 fibroblasts cultures for a period of 27 min. Half of the disks stayed in rest (control) and the other half was centrifuged with a force of 600G. The cells were marked with a reagent SYBR Gold and counted in a microscope of inverted light. The countings, accomplished by areas, they were analyzed by the test "t" of Student and ANOVA. For the accomplished analysis it was possible to verify the presence of larger amount of cells before the centrifugations (110 + 101, group control; 30 + 36 centrifuged group). In an analysis being considered the treatment of the surface of titanium was verified the following averages: 70,9 + 88,4 for the non polished grupo (control) ; 151,0 + 110,1 for the polished group (control); 33,1 + 39,1 for the non polished group centrifuged; and 27,6 + 38,9 for the polished group centrifuged. The differences were significant among the groups controls and centrifuged, for both disks (non polished and polished). This way it was possible to conclude that the method of evaluation of the cellular adhesion was efficient, the polished surface of titanium allows larger cellular growth however with inferior adhesion to the non polished surface.

KEY WORDS: Cellular adhesion; centrifugal forces; L929 Fibroblast; Titanium.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 Desenho esquemático para mostrar como atuava a força centrífuga sobre os discos de titânio.....31
- Figura 4.2 Fotomicrografia do disco de titânio usinado. Grupo controle. A seta indica as ranhuras do processo de usinagem.....34
- Figura 4.3 Imagem da tela do Software ImageLab 2000 durante a contagem de células.....34

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 5.1	Teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov.....	33
Tabela 5.2	Médias e desvios-padrões dos grupos antes e após as centrifugações.....	33
Tabela 5.3	Teste “t” de Student. Significância de 5%.....	34
Gráfico 5.1	Representa as médias com os respectivos desvios-padrões..	34
Tabela 5.4	Teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov.....	35
Tabela 5.5	Teste ANOVA. Significância 5%.....	36
Gráfico 5.2	Representação gráfica das médias e desvios-padrões das contagens de células por regiões.....	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Titânio.....	14
2.1.1 Propriedades de superfície dos implantes de titânio.....	18
2.1.2 Tipos de tratamentos de superfícies de titânio.....	21
2.1.3 Efeitos das superfícies de titânio sobre as estruturas biológicas.....	23
2.2 Adesão celular.....	23
2.2.1 Integrinas.....	24
2.2.2 Fibronectina.....	24
2.3 Cultura celular.....	25
2.3.1 Linhagem celular L929.....	25
2.4 Avaliação da adesão celular.....	26
3. PROPOSIÇÃO.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Discos de titânio.....	28
4.2 Dispositivo para centrifugação dos discos de titânio com células aderidas.....	29
4.3 Cultura de fibroblastos.....	30
4.4 Teste de adesão de fibroblastos sobre discos de titânio.....	31
4.5 Análise das células aderidas sobre discos de titânio.....	32
4.6 Análise estatística.....	32
5. RESULTADOS.....	33
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos trinta anos o desenvolvimento e uso de implantes osteointegrados tem revolucionado a odontologia e oferecido mais uma modalidade de tratamento para reabilitar pacientes parcial ou totalmente edentados. Até então, estes pacientes somente poderiam ser tratados com próteses parciais removíveis e fixas suportada sobre dentes e/ou mucosa. (Bränemark et al., 1977; Adell et al., 1981; Cox e Zarb ,1987; Albrektsson et al., 1998).

Os implantes endósseos são aceitos como modalidade de tratamento em odontologia na reabilitação oral e crânio facial, servindo de suporte na confecção de elementos dentários. A evolução dos implantes está relacionada a vários estudos que possam melhorar a compreensão dos fenômenos biológicos na interface implante de titânio e os tecidos biológicos que se relacionam com o mesmo. (Albrektsson et al.1985).

Com o surgimento de técnicas de cultura celular, muitas pesquisas que anteriormente só podiam ser realizadas por meio de ensaios em animais ou em humanos passaram a ser realizadas inicialmente com estas células.

Os fibroblastos são as células do tecido conjuntivo e são importantes nos mecanismos de reparação tecidual e na fase de remodelamento dos tecidos (Pan et al., 2006).

A cultura de fibroblastos é bastante utilizada no entendimento dos processos biológicos do comportamento celular em biomateriais na implantodontia. (Verrier et al., 1996).

Com a grande demanda de novos sistemas de implantes e componentes protéticos, as integrações entre os tecidos biológicos e estas estruturas continuam a ser investigadas.

O estudo e a comparação entre o titânio usinado (utilizado na confecção dos implantes) e polido (utilizados como *abutments*) vêm ganhando importância na literatura científica, levando à introdução de novas técnicas de confecção, o que leva as novas metodologias de pesquisas.

Embora os dados encontrados na literatura sobre propriedades das superfícies de titânio e seus efeitos nos tecidos biológicos na adesão de fibroblastos não sejam conclusivos, isto nos permite confirmar a necessidade de novos estudos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O desenvolvimento dos implantes dentais revolucionou as possibilidades de reabilitação para pacientes parcial ou totalmente edentados. Diversos estudos longitudinais têm mostrado altas taxas de sucesso com a utilização dessa opção terapêutica.(Adell R, Lekholm U, Röckler B, Bränemark PI,1981; Albrektsson T; Dahle E, Enborm L, 1988; Bränemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, et al., 1977).

Os implantes osseointegráveis têm passado por consideráveis avanços desde os primeiros estudos realizados por Bränemark e colaboradores, no final da década de 50, 60, 70 (Adell et al.,1981; Bränemark et al., 1984).

O efeito do titânio sobre os tecidos vivos e seus fenômenos biológicos ainda não são totalmente conhecidos. Alterações na superfície do titânio têm sido sugeridas para aumentar o contato celular sobre o mesmo, a usinagem da superfície do titânio produz irregularidades em sua superfície que promovem o espaço para a migração celular.(Misch CE 1999).

2.1 Titânio

O elemento metálico titânio, símbolo Ti, é conhecido por sua excelente resistência mecânica e por não sofrer corrosão. É tão forte quanto o aço, porém menos denso e 45% mais leve. Quando puro e em ambiente sem oxigênio é dúctil e fácil de ser trabalhado. Seu ponto de fusão é alto, sendo refratário em grandes temperaturas. Estas características permitem que o metal seja muito resistente à fadiga. Quando exposto ao ar, uma camada passiva de óxido de titânio forma-se sobre sua superfície. O termo titânio comercialmente puro (titânio cp), é usado para indicar a ausência de ligas em sua composição e quantidades mínimas de alguns

elementos como carbono, ferro e o oxigênio, de acordo com Greenwood et al em 1998.

O titânio possui excelente resistência mecânica, seu ponto de fusão é alto, sendo refratário em grandes temperaturas e possui pouca corrosão por ácidos fracos e corrosão acentuada por ácidos fortes, é utilizado na confecção de implantes. Na composição do titânio estão presentes os elementos carbono, ferro e oxigênio. O grau de pureza do titânio está classificado pela quantidade de oxigênio presente sendo Graus I, II, III e IV (Albrektson, 1985).

O oxigênio também determina os vários níveis de resistência. Titânio comercialmente puro (Ti cp) é composto por 99,75% de titânio (Greenwood et al 1998).

O titânio interage com os fluidos biológicos através de sua camada estável de óxido que tem o principal papel em sua excepcional biocompatibilidade (Pilla RM; Weatherly JC, 1986; Lautenschlager EP; Monaghan P, 1993).

Tanto a espessura como a composição química de óxido de titânio podem ter papel importante na adsorção de proteínas, dos fluidos biológicos e atração de células para sua superfície. (Lausmaa J, Kasemo B, Mattsson H, Odellius H 1990; Ask M, Lausmaa J, Kasemo B, 1988-1989).

O titânio comercialmente puro (Ti cp) é o material de escolha para a confecção dos implantes endósseos, pois é um metal que possibilita reação tecidual favorável, estabilidade química dos componentes, estimula a atividade celular na formação da matriz óssea, tem elevada resistência à corrosão e não provoca reações de hipersensibilidade ou imunológicas (Bowers T, 1992).

A biocompatibilidade do titânio é bastante influenciada por algumas propriedades de sua superfície, tais como, a composição química, textura da superfície, uma combinação entre topografia e rugosidade (Schwartz & Boyan, 1994)

Quem controla a produção comercial do titânio é a sociedade americana para análise e padronização de materiais (ASTM), que estabelece normas específicas para os graus de contaminação do titânio e para suas ligas de Ti6Al4V, utilizada na fabricação de implante de uso cirúrgico (ASTM, 2000). A Tabela abaixo apresenta as diferentes concentrações dos elementos nitrogênio, carbono, hidrogênio, ferro, oxigênio e titânio, assim como suas propriedades mecânicas, que determinam os diferentes graus do Ti. A Tabela abaixo mostra as concentrações máximas permitidas para as impurezas em Ti cp e ligas (% em peso).

Liga	Elemento (% de impureza)							
	N	C	H	Fe	O	Al	V	
Ti grau I		0,03	0,10	0,015	0,02	0,18	-	-
Ti grau II		0,03	0,10	0,015	0,03	0,25	-	-
Ti grau III		0,05	0,10	0,015	0,03	0,35	-	-
Ti grau IV		0,05	0,10	0,015	0,05	0,40	-	-
Ti6Al4V		0,05	0,08	0,012	0,25	0,13	5,5 – 6,5	3,5 – 4,5

Tabela referente às impurezas do Ti cp em peso. (Fonte: Standard specification for unalloyed titanium for surgical implant applications. Designation: F 67–95. In: **Annual book of ASTM standards. Medical devices and services**, v. 13.01, p. 1-3, 1997).

As propriedades físicas e químicas da superfície são de fundamental importância para se poder discutir a adesão. A importância se deve a vários tipos de interações como forças de Van-der Waals, fortes uniões químicas e outras que estão na dependência da microestrutura de superfície em escala atômica.

O Ti cp usinado está sendo exposto de forma repentina a uma atmosfera constituída de ar ficando o mesmo susceptível à dissociação das moléculas de

oxigênio no ar, resultando numa formação rápida de óxido na superfície (Kasemo et al,1987).

Segundo Williams em 1994 nenhum material é totalmente biocompatível; entretanto, quando utilizado de forma apropriada, este pode realizar uma performance de alto nível e desenvolver um comportamento ótimo.

Há, contudo um aspecto importante que deve ser analisado e que diz respeito a sua biocompatibilidade, isto é, como o meio biológico responde aos estímulos induzidos pelo material estranho, e ao mesmo tempo, como esse material implantado responde química e fisicamente ao ambiente biológico (Cooper et al., 1998). Muitos trabalhos consideram que um acabamento rugoso pode favorecer as etapas iniciais de adesão celular durante a cicatrização do implante, a produção de certas proteínas ou a atuação de hormônios ou fatores de crescimento das células ósseas (Martin, J Y. et al. 1995).

2.1.1 Propriedades de superfície dos implantes de titânio

A rugosidade de superfície tem se mostrado em diversos estudos in vitro como um importante parâmetro que influencia a resposta biológica básica (Bowers et al.1992; Keller et al.1990; Martin et al., 1995; Boyan et al., 1998; Ong et al., 1997). Boyan et al., 1998; Chu P.K., Chen J.Y., Wang L.P., et al.2002).

Porém, a influência final da configuração micro geométrica e textura de superfície final sobre a resposta óssea ainda não é completamente compreendida. (Cooper et al.,1998).

A interação das células com um biomaterial depende da topografia, composição química e estrutura da superfície dos materiais.

Estas características de superfície determinam como as moléculas biológicas vão adsorver a superfície e, mais particularmente, determinam a orientação das moléculas adsorvidas. Elas também determinam o comportamento celular no contato. Células em contato com uma superfície primeiramente se ligam, aderem e se espalham. A primeira fase depende das proteínas de adesão, depois a qualidade desta adesão influenciará na sua morfologia, e sua capacidade para proliferação e diferenciação. A comparação do comportamento de diferentes tipos de células mostra que elas reagem diferentemente de acordo com a rugosidade das superfícies. Exame microscópico de células ósseas em materiais com várias rugosidades de superfície em geral demonstraram que o espalhamento das células e formação de camadas de células contínuas era melhor em superfícies lisas comparadas com as rugosas. Isso confirma que não basta à superfície ser rugosa, mas precisa também ser organizada e uniforme (Kasemo, 2002).

Michaels, CM et al em 1989 estudou a adesão celular sobre superfícies de Ti com vários graus de rugosidade, fibroblastos de ligamento periodontal humano ou osteoblastos da calvária de ratos em meio apropriado foram incubados sobre várias superfícies de Ti por mais de 2 horas. O número de células que não aderiram foi quantificado e a porcentagem de células aderidas foi então calculada. Cultura de tecido em plástico foi usada como controle para aderência celular (CA). Com 15 minutos a CA e os fibroblastos do ligamento periodontal apresentaram índices maiores sobre as superfícies lisas (41%) e menores nas superfícies rugosas (28%). Com 2 horas, a CA foi aproximadamente à mesma para as duas superfícies e o controle (80%). Já para os osteoblastos a resposta foi diferente. Inicialmente, aos 15 minutos, a CA foi à mesma para superfícies lisas ou rugosas (30%). Contudo após 2 horas, a CA para superfícies rugosas (63%) e para o controle (64%) foi

significativamente maior do que sobre a superfície lisa. Este trabalho sugeriu que diferentes células do tecido conjuntivo apresentaram respostas variadas à rugosidade superficial, a qual pode, portanto, influenciar a resposta biológica aos implantes.

Bowers et al em 1992, estudaram a influência da rugosidade superficial de superfícies de titânio com relação à aderência de células osteoblásticas. Discos de Ti cp foram preparados de maneira a produzir superfícies regular e irregular. Os discos com morfologia irregular foram polidos usando papel metalográfico de granulação 600 e a seguir jateados com Al_2O_3 em partículas de 50 μm ou condicionai por ataque ácido com HF 3,5%/HNO₃ 25% por 1, 5 ou 10 minutos. As superfícies com morfologias regulares foram produzidas usando papel metalográfico de granulação 60 ou 120. O grupo controle foi polido usando papel de granulação 600 para fazer a medida da rugosidade no perfilômetro. Todos os discos foram limpos com solvente, lavados em água destilada, passivados com ácido nítrico e submetidos à lavagem final com água destilada, para então serem secos a vácuo. A partir daí foram esterilizados pela exposição à luz ultravioleta por 30 minutos. Para obtenção dos dados foram usados perfilômetro para avaliar a rugosidade superficial, meio de cultura com células da calvária de ratos para verificar a adesão células e SEM para determinar as características morfológicas das células em função das várias superfícies e intervalos de tempo. Os resultados sugeriram que o tipo de rugosidade produzida sobre superfície de Ti cp afeta a resposta biológica inicial tal como a aderência celular. A superfície irregular produzida pelo jateamento pareceu ser mais condutiva para a aderência celular do que a superfície rugosa produzida pelo polimento/lixamento ou ataque ácido. Níveis significativamente mais altos e aderência celular foram encontrados nestas superfícies jateadas. As características

físicas que influenciam a biocompatibilidade são muitas e a principal é a topografia do material. A arquitetura da superfície do material condiciona a relação das células com a superfície do material. Ele pode ser liso ou rugoso com a intenção de aumentar a superfície de contato e criar zonas de ancoragem biológica. Mas, em todo caso, a topografia do material tem uma influência positiva ou negativa, *in vivo* e *in vitro*, sobre a adesão, a migração, a orientação, e morfologia das células e da síntese de proteínas matriciais. Os materiais são raramente usados em estado bruto havendo a necessidade de usinagens de tratamentos de sua superfície com adição (por exemplo hidroxiapatita) ou por subtração ataque ácido, por polimento mecânico com discos abrasivos. Estas alterações de superfícies e de rugosidades desenvolvem um papel importante na resposta celular. (Pellenc D 2005).

Isso é demonstrado por um estado de superfície dado de um mesmo material, a resposta observada *in vitro* diferem apenas no tipo de células. Os fibroblastos aderem melhor sobre superfícies lisas (Richards, 1996 Walboomers et al 1998).

Segundo Brunette em 1986 e Chehroudi et al em 1990 as células epiteliais aderem e proliferam melhor sobre superfícies lisas ou modificadas por ácidos que superfície preparadas por polimento.

Já segundo Buser et em 1991 e Wennerberg et al em 1995 os osteoblastos preferem as superfícies um pouco mais rugosas. Ainda sobre a topografia, a energia de superfície do material influencia a relação proteína –substrato. Ela determina a natureza a quantidade de proteínas adsorvidas.

2.1.2 Tipos de tratamentos de superfícies de titânio

A usinagem da superfície do titânio provoca uma aspereza na superfície, distinta da superfície lisa ou polida (Cooper, LF; 2000)

O método de usinagem tem sua importância na formação da superfície não tratada; porém os fabricantes de implantes preferem, métodos para tratar estas superfícies. Existem quatro maneiras de preparo das superfícies do titânio.

Quando não se emprega qualquer tratamento após a usinagem, e fazendo apenas etapas de limpeza, que devem ser realizadas para remoção de cavacos de usinagem e retiradas do óleo de corte. Outra maneira de melhorar a superfície após usinagem, modificando-a por adição de material.

Quando se recobre o titânio por aspensão térmica chamado de plasma “spray” (“titânio plasma spray”, TPS) – ou aplicando substâncias bioativas (HA hidroxiapatita, fosfato tricálcio e biovidro), dentre elas se destaca os fosfatos de cálcio (De Groot 1998). A hidroxiapatita / $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ / HA é um fosfato de cálcio cerâmico que tem vantagens e desvantagens, quando depositado na superfície do titânio, pois apesar do comprovada ação na adesão de osteoblastos, promove um progressivo enfraquecimento nas ligações na interface do titânio podendo levar à dissolução do recobrimento ou deslocamento do mesmo, com o passar tempo. (Yan and Davies 1998).

A terceira forma de preparo da superfície é a abrasão - jateamento com partículas abrasivas como a Al_2O_3 , a TiO_2 , o NaCl ou até com $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

A quarta forma de preparo de superfície é a erosão - ataque com ácidos por imersão ($\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$, HF/HNO_3 e HNO_3). Alguns tratamentos químicos superficiais são utilizados especificamente para remoção de contaminantes oriundos do processo de usinagem dos implantes. Um tratamento químico superficial em duas etapas, sobre titânio de pureza comercial é proposto por (De Groot 1998) qual seja uma primeira etapa com solução à base de ácido clorídrico e ácido sulfúrico, e uma

segunda etapa com solução à base de hidróxido de sódio. Combinada (abrasão + erosão) uma proposta combinada de duas técnicas subtrativas.

Há normas de fabricação que citam algumas operações necessárias para a remoção de graxas, óleos, resíduos de usinagem e descontaminação. Dentre elas: ASTM F86-91 (Elias et al. 1999). Segundo Brunette et al em 1988 a adesão e o espalhamento das células em superfícies são associados às microestruturas que podem ser caracterizadas por microscopia óptica ou eletrônica. As principais estruturas de contato são: contato estreito, contato focal, matriz extracelular e hemidesmossoma.

2.1.3 Efeitos das superfícies de titânio modificadas sobre as estruturas biológicas.

Recentemente há uma vasta literatura a respeito das características das superfícies de titânio como topografia, rugosidade, composição química. Estas propriedades podem influenciar a adsorção de substratos e de células sobre as superfícies de titânio (Degasne I, Basle MF, Demais V, Hure G, Lesoud M, Grolleau B, Mercier L, Chappard D 1999). Contudo como os mecanismos e propriedades da superfície afetam o comportamento celular não está ainda esclarecido. A rugosidade da superfície precisa ser considerada não só em termos de amplitude, mas também de organização. (Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufrene E, Judas D, Iost A, Hardouin P, 2000).

2.2 Adesão celular

É um fenômeno chave na evolução multicelular é a habilidade das células se aderirem e poder se comunicar entre si. As moléculas de células -adesão ou CAMs que permitem interação entre si e com a matriz de extracelular circunvizinha (ECM).

Segundo Contran e Kumar em 2000, isto resulta na organização dos tecidos, estas interações resultam na ativação de transdução específico numa cascata de funcionamento celular desejado. Ainda conforme avaliações do mesmo autor as funções da adesão celular incluem a formação e interconexão de vários sistemas vários vertebrados, bem como a manutenção da integração do tecido, cicatrização de ferimentos, movimentos morfogênicos, migração celular há dois tipos de moléculas de adesão relacionadas com a superfície do metal titânio, a integrina e fibronectina.

2.2.1 Integrinas

É um grupo de glicoproteínas transmembranas constituídas de heterodímeros não covalentes. Elas interagem com uma grande variedade de ligantes, incluindo glicoproteínas da matriz extracelular e com outras células, enquanto seus domínios intracelulares interagem com o citoesqueleto de cada célula. Elas possuem receptores para moléculas de adesão e esses receptores participam da adesão célula-célula e célula-matriz em muitos processos fisiologicamente importantes, como desenvolvimento embrionário, hemostasia, trombose, cura de ferimentos, resposta de defesa imunológica ou não imunológica. São responsáveis pela interação célula-célula e célula- matriz extracelular. (Chan PC et al 2006).

2.2.2 Fibronectina

A fibronectina, uma proteína envolvida na adesão celular, presente no soro, interage com as glicosaminoglicanas e o citoesqueleto permitindo a adesão e o espraiamento celulares. É possível que uma superfície rugosa possa adsorver mais fibronectina que uma superfície lisa e conseqüentemente, promover a adesão de um maior número de células (Martin et al.,1995).

Dentre as propriedades da fibronectina, destaca-se em particular a habilidade de promover adesão de fibroblastos e osteoblastos à superfícies de biomateriais, incluindo o titânio de implantes dentais (Schneider & Burridge, 1994; Ioachim *et al.*, 2002)

2.3 Cultura celular

De acordo com Majeska em 1996 o cultivo celular permite o acesso a informações celulares e moleculares que contribuem para o desenvolvimento da engenharia nanoestrutural aplicada ao implante e ao levantamento de hipóteses significantes para serem testadas *in vivo*. Nesta linha de pensamento, a cultura de células oferece condições para investigar os aspectos da interação entre o titânio e as células fibrobláticas, e assim entendermos estes processos.

2.3.1 Linhagem celular L929

As células L929 são uma linhagem de fibroblastos recomendadas para testes de citotoxicidade (Serrano *et al.*, 2004). O subclone L929 da linhagem parental L, foi estabelecida por W. R. Earle no ano de 1940 e foi uma das primeiras linhagens celulares a serem estabelecidas em cultura contínua. A linhagem L é derivada do tecido areolar subcutâneo e adiposo de um camundongo macho C3H/An de 100 dias. (American Type Culture Collection: Catalogue of Cell Lines & Hybridomas. 8th ed. Rockville, 1994).

Segundo (Pan *et al* 2006) os fibroblastos são as células predominantemente encontradas em tecidos conectivos perdidos ou danificados, e são importantes nos mecanismos de reparação tecidual e na fase de remodelamento dos tecidos. Estas células são importantes na produção de muitos componentes essenciais do tecido

conectivo, como os componentes de matriz extracelular e, no tecido fibroso, o colágeno (Baxter et al.,2002; Rae, 1981). O encapsulamento fibroso é causado pelas células tipo fibroblasto que aderem às suas vizinhas preferencialmente ao suporte, e pode prejudicar a efetividade dos implantes (Baxter et al., 2002; Brunette e Chehroudi, 1999).

A adesão de fibroblastos a um biomaterial ajuda na integração do tecido conectivo mole ao implante, adicionando vascularização à superfície do implante e diminuindo a chance de encapsulamento fibroso e infecção bacteriana (Richards,1996). Estudos do comportamento celular sobre biomateriais e de implantes podem colaborar para a evolução de técnicas de engenharia de tecidos mais efetivos os modelos de cultura celular estão se tornando prevalentes na investigação de respostas de tecidos a materiais de implantes (Verrier et al., 1996).

Em experimentos o uso de métodos in vitro pode reduzir a extensão de testes em animais e pode reduzir significativamente o tempo e o custo dos testes (Kumari et al.;2002).

2.4. Avaliação da adesão celular

Há vários métodos de avaliação da adesão de células aos substratos. Um método utiliza a observação em MEV (microscopia eletrônica de varredura) da morfologia dos processos celulares ancorados às superfícies (Nakamura et al, 2005). Outros métodos empregam a medição das forças requeridas para retirar as células do substrato. Isso pode ser obtido através da utilização de um micromanipulador, de uma centrífuga, ou de um fluxo hidrodinâmico ("flow cell"). (Nakamura et al, 2005). Em 1997 Andrés J. García e colaboradores desenvolveram um método para medir a adesão celular sobre superfícies de titânio. Ele criou um dispositivo que foi acoplado a uma centrífuga e dentro dele ficava um disco de

titânio. Com este sistema para medir a força de adesão de receptores ligantes de moléculas de adesão integrinas e a força necessária para romper esta adesão. Neste sistema foi medido de maneira experimental como ocorre ativação do receptor integrina. Pode-se medir indiretamente o quanto houve de adesão, tempo aproximado da adesão e a força para romper esta adesão.

Gallant ND e colaboradores em 2005 repetem o experimento de García AJ e colaboradores 1997e 1998, usando força de centrifugação com cultivo celular em 15 minutos e testam a força de adesão das células e a presença de integrinas.

Vários experimentos têm sido usados para detalhar este fenômeno de adesão celular medindo a força de centrifugação e a hidrodinâmica. Embora outros métodos tenham conseguido medir a força de adesão, isto depende da ação das moléculas de adesão, e este fenômeno ainda é pouco conhecido (Nakamura 2005).

Em 1998 Derhami e colaboradores usando cultura de células e centrifugação, mas com algumas diferenças dos experimentos realizados por Garcia et al. (1998), utilizaram discos de titânio dentro de criotubos e após centrifugação de $40.000 \times g$, por 10 min e a seguir com rotações de 1.600, 16.900, 22.500 ou $40,000 \times g$ ($g = 981$ dynes/g). A força aplicada para as células foi calculada usando a formula abaixo:

$$F = (\text{Densidade da célula} - \text{Densidade do meio}) \times \text{Volume da célula} \times \text{RCF} \times 981.$$

3. PROPOSIÇÃO

O presente trabalho propõem um método de avaliação de adesão celular em centrífuga comercial, além de avaliar o processo de adesão de fibroblastos L929 cultivados sobre discos de titânio usinados e polidos, por meio de força centrífuga.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Discos de titânio

Foram utilizados 10 discos de titânio ASTM F-67 Gr.4 usinados e 10 discos de titânio ASTM F-67 Gr. 4 polidos com medidas padronizadas de 1mm de espessura e 13 mm de diâmetro possuindo um orifício central de 1mm de diâmetro. Os discos foram obtidos do fabricante Carpenter Engineered Materials, fornecidos pela Implacil Material Odontológico Ltda., São Paulo, SP, especialmente confeccionados para estes experimentos. A descontaminação e esterilização foram realizadas segundo o protocolo do fabricante fornecedor dos implantes.

A usinagem foi realizada em um torno CNC TRAUB 12/7 TX8i, em rotação de 1.000 rpm, com avanço F0.01 mm/rotação, conforme protocolo informado pelo fabricante. O polimento dos discos, realizado pelo fabricante, seguiu o mesmo protocolo dos *abutments* comercializado para os implantes De Bortoli. Devido à impossibilidade de fixação dos discos no suporte utilizado para o polimento, foram lixados à mão, com malha 1200 e 1500, e polidos com massa de Cromonox (pasta para polimento) em politriz com bucha de pano.

4.2. Dispositivo para centrifugação dos discos de titânio com células aderidas

Para realizar os experimentos de adesão de fibroblastos L929 sobre discos de titânio foi elaborado um dispositivo que permitia colocá-los perfeitamente encaixados dentro de tubos cônicos de polipropileno de 15 mL (TPP, Suíça) normalmente utilizados em centrífuga Fanem modelo BL, conforme registro de patente requerido.

Com o auxílio do dispositivo, o disco de titânio foi posicionado de modo que as células permaneciam voltadas para o fundo do tubo de polipropileno conforme desenho esquemático (Figura 4.1).

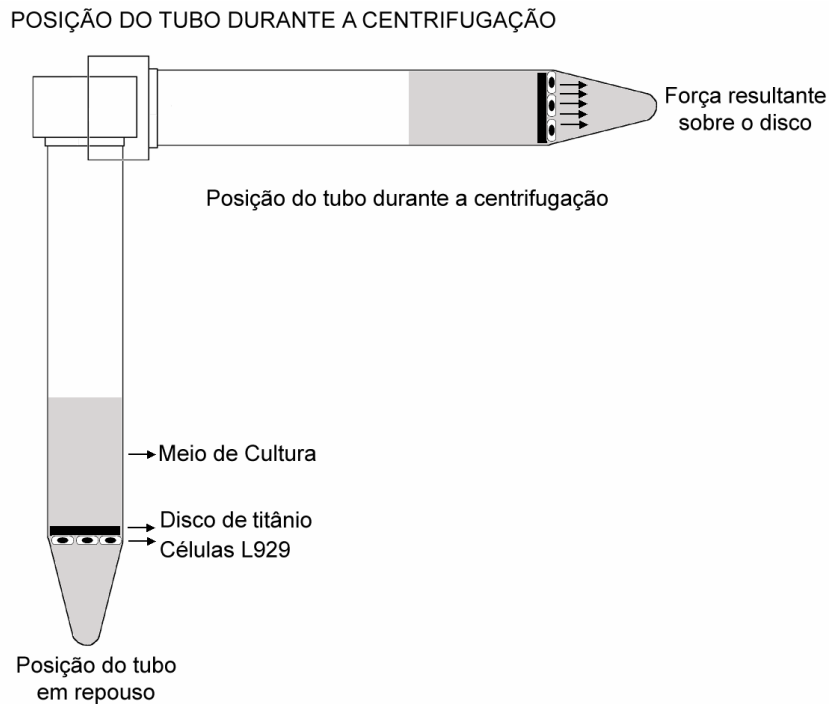


Figura 4.1 - Desenho esquemático para mostrar como atuava a força centrífuga sobre os discos de titânio.

4.3. Cultura de fibroblastos

Todos os procedimentos experimentais com cultura de células foram realizados no Laboratório de BIODONTOLÓGIA da Universidade Ibirapuera. Foram utilizadas células NCTC clone 929 linhagem L procedentes da *American Type Culture Collection* (ATCC) adquiridas no Instituto Adolfo Lutz. As células foram mantidas sob condições de cultura em frascos de 75 cm² (TPP, Suíça) em meio mínimo essencial (DMEM; Cultilab, Campinas, SP) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP), sulfato de gentamicina 50µg/L e

anfotericina B (2 μ g/L) em estufa (Sanyo – modelo COM -15) em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37 °C. Após o período de 72h de cultura, as células foram destacadas dos frascos com solução de ATV (tripsina 0,2% e versene 0,02%) procedente do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. Em seguida foram centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min em centrífuga Fanem modelo BL, ressuspensas em meio DMEM suplementado com SFB 10% e contadas em hemocitômetro (câmara de Neubauer - Boeco, Hamburg, Germany) utilizando-se o método de exclusão pelo azul de Trypan (Freshney, 2000).

4.4 Teste de adesão de fibroblastos sobre discos de titânio

As células após a contagem foram colocadas sobre os discos de titânio polidos e usinados, distribuídos em placa de cultura de 24 poços (TPP, Suíça) na proporção de 1,5 x 10⁵ células / poço e cultivadas por 27 minutos em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37 °C para permitir a adesão dos fibroblastos. Após o período de cultura os discos de titânio com as células aderidas foram acoplados aos dispositivos, colocados nos tubos cônicos de polipropileno de 15 mL com meio DMEM suplementado com SBF 10% e distribuídos em 4 grupos sendo que cada grupo foi constituído por 5 discos de titânio. Os grupos foram denominados:

- 1) Grupo usinado sem centrifugação – U 0G (controle)
- 2) Grupo usinado com centrifugação – U 600G (experimental)
- 3) Grupo polido sem centrifugação – P 0G (controle)
- 4) Grupo polido com centrifugação – P 600G (experimental)

Em seguida os tubos dos grupos experimentais foram centrifugados a 600G por 5 min em centrífuga Fanem modelo BL e os tubos dos grupos controles permaneceram na estante sem centrifugação, também por 5 min.

Após a centrifugação os discos de titânio dos grupos controles e experimentais com as células aderidas foram submetidos à rápida lavagem em solução de tampão fosfato salina 0,1M pH 7,4 e fixados em formol 10% tamponado durante 10 min. A seguir cada disco de titânio recebeu 100 µL do corante fluorescente SYBR Gold (Molecular Probes, Inc., OR, USA), um corante com alta afinidade por ácidos nucleicos, diluído 10.000 vezes em PBS 0,1 M pH 7,4 (SIGMA-ALDRICH, Inc, MO, USA).

4.5 Análise das células aderidas sobre discos de titânio

Cada disco de titânio com as células aderidas e coradas pelo SYBR Gold foi colocado sobre uma lâmina de vidro tomando-se o cuidado de manter a face com as células voltadas para baixo e em contato com a lâmina.

Para a observação das células utilizou-se um microscópio invertido Nikon modelo Eclipse TS100 no qual foi adaptado um dispositivo com LED de luz azul de 470 nm de 1,5 watts inclinado em 45 graus com feixe direcionado para a parte inferior do disco de titânio e filtro amarelo sobre a objetiva de 4X.

As fotomicrografias foram obtidas por meio de uma câmera digital Nikon Coolpix acoplada ao microscópio e quantificadas pelo software ImageLab onde as células marcadas pelo fluorescente foram contadas manualmente (figuras 4.2 e 4.3).

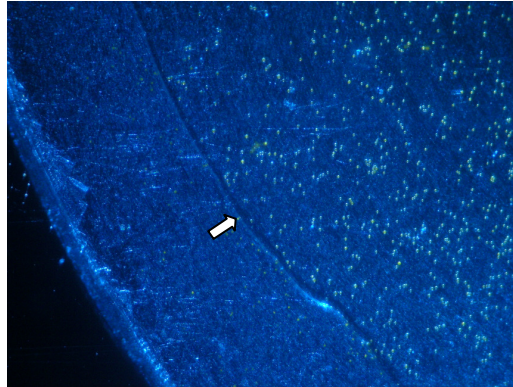


Figura 4.2 – Fotomicrografia do disco de titânio usinado. Grupo controle. A seta indica as ranhuras do processo de usinagem.

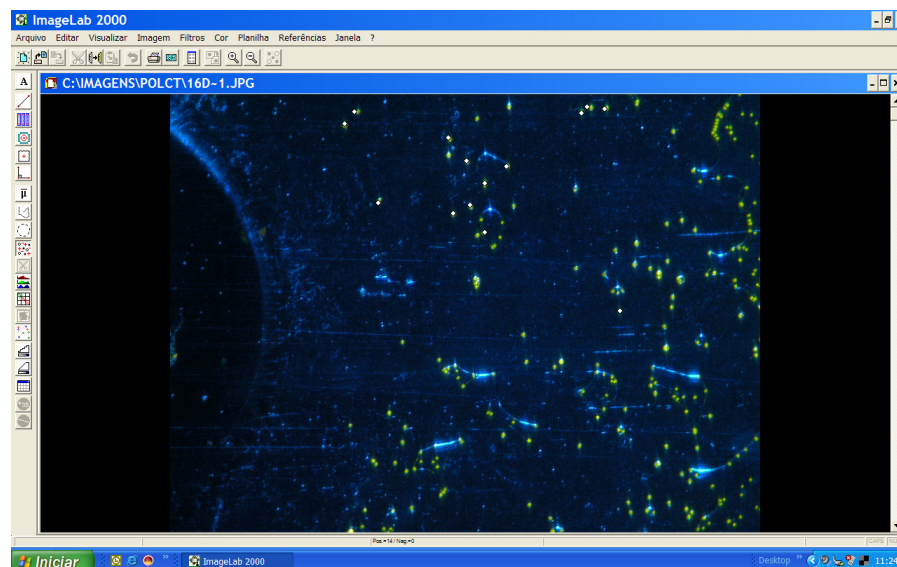


Figura 4.3 – Imagem da tela do Software ImageLab 2000 durante a contagem de células.

4.6 Análise estatística

A normalidade das variáveis foram testadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov Z e analisadas pelo teste t Student e ANOVA e consideradas significantes quando $p < 0,05\%$.

5. RESULTADOS

Inicialmente foram comparados os resultados das contagens de células por campos antes e após as centrifugações, independentemente das superfícies testadas. Os dados foram analisados quanto sua distribuição, sendo considerados com distribuição normal (tabela 5.1). Os valores das médias e desvios-padrões encontram-se na tabela 5.2.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

CENTRIFU		CELL
0G	N	10
	Normal Parameters ^{a,b}	
	Mean	110,9456
	Std. Deviation	101,70049
	Most Extreme Differences	
	Absolute	,211
	Positive	,211
	Negative	-,207
	Kolmogorov-Smirnov Z	,668
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,764
600G	N	10
	Normal Parameters ^{a,b}	
	Mean	30,3572
	Std. Deviation	36,94055
	Most Extreme Differences	
	Absolute	,287
	Positive	,287
	Negative	-,224
	Kolmogorov-Smirnov Z	,908
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,382

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Tabela 5.1 – Teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov

Group Statistics

CENTRIFU		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CELL	0G	10	110,9456	101,70049	32,16052
	600G	10	30,3572	36,94055	11,68163

Tabela 5.2 – Médias e desvios-padrões dos grupos antes e após as centrifugações.

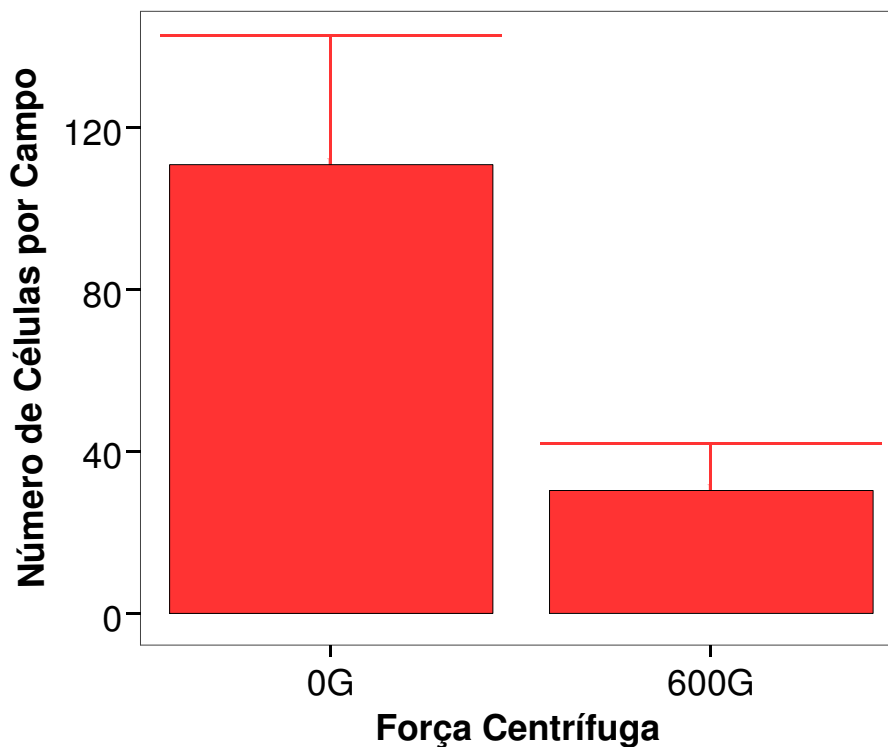
Estas médias foram comparadas pelo teste estatístico paramétrico teste “t” de Student, a um grau de confiança de 5% (tabela 5.3). Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, o que significa que com um grau de certeza de 95% existem diferenças entre as contagens de células antes e após as centrifugações dos discos de titânio, independentemente do tratamento realizado.

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
CELL	21,647	,000	2,355	18	,030	80,5883	34,21636	8,70243	52,47424
Equal variances assumed									
Equal variances not assumed			2,355	11,334	,038	80,5883	34,21636	5,54867	55,62799

5.3 – Teste “t” de Student. Significância de 5%.

O gráfico 5.1 representa as médias com os respectivos desvios-padrões.



Para uma comparação dos grupos, levando-se em conta os tratamentos superficiais dos discos de titânio a distribuição destes foi analisada, pelo mesmo teste descrito anteriormente (tabela 5.4).

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

GRUPO		CELL	
Usinado (0G)	N	5	
	Normal Parameters ^{a,b}	Mean	70,9083
		Std. Deviation	84,39222
	Most Extreme Differences	Absolute	,306
		Positive	,306
		Negative	-,234
	Kolmogorov-Smirnov Z	,685	
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,736	
Usinado (600G)	N	5	
	Normal Parameters ^{a,b}	Mean	33,1200
		Std. Deviation	39,15619
	Most Extreme Differences	Absolute	,276
		Positive	,276
		Negative	-,225
	Kolmogorov-Smirnov Z	,618	
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,840	
Polido (0G)	N	5	
	Normal Parameters ^{a,b}	Mean	150,9828
		Std. Deviation	110,19179
	Most Extreme Differences	Absolute	,269
		Positive	,179
		Negative	-,269
	Kolmogorov-Smirnov Z	,601	
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,863	
Polido (600G)	N	5	
	Normal Parameters ^{a,b}	Mean	27,5944
		Std. Deviation	38,96241
	Most Extreme Differences	Absolute	,355
		Positive	,355
		Negative	-,259
	Kolmogorov-Smirnov Z	,793	
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,555	

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Tabela 5.4 - Teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov

Pelo fato da distribuição também ser considerada normal, as comparações dos grupos foi realizada pelo teste estatístico paramétrico ANOVA a um grau de confiança de 5% conforme tabela 5.5.

ANOVA

CELL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3578,518	3	16192,839	2,903	,067
Within Groups	9262,221	16	5578,889		
Total	137840,7	19			

Tabela 5.5 – Teste ANOVA. Significância 5%.

Pela análise da tabela 5.5 podemos verificar que as diferenças verificadas entre as amostras só foi conseguida a um grau de significância de 93%, inferior ao estabelecido inicialmente (95%). Devido à grande proximidade das significâncias, associado ao pequeno número de repetições de cada grupo, a hipótese de nulidade foi rejeitada, aceitando-se o fato de haver diferenças entre os grupos analisados.

O gráfico 5.2 representa as médias dos grupos e os respectivos desvios-padrões.

Uma análise do gráfico 5.2 permite dizer que com um grau de certeza de 93% existem diferenças entre os grupos, menos para o grupo usinado 600G e o grupo polido 600G.

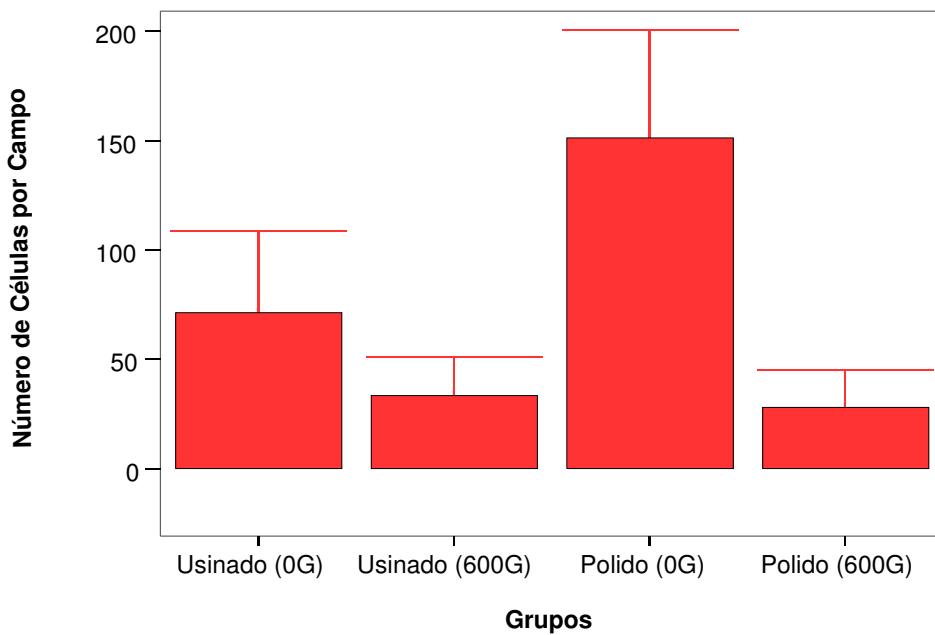


Gráfico 5.2 -Médias e desvios-padrões das contagens de células por regiões.

6. DISCUSSÃO

Inicialmente alguns comentários com respeito às células utilizadas se fazem necessários. A utilização de fibroblastos, apesar de não participarem diretamente dos processos de osteointegração dos implantes endosseos, é importante nos mecanismos de reparação tecidual e na fase de remodelamento dos tecidos tanto quanto os osteoblastos e células epiteliais. (Pan *et al.*, 2006).

Este princípio de adesão celular é conseguido pela presença das moléculas de integrina e fibronectina, independe da topografia da superfície dos materiais empregados. (Pellenc D 2005).

Segundo Richards (1996), os fibroblastos aderem preferencialmente sobre superfícies lisas, enquanto osteoblastos em superfícies rugosas (Wennerberg *et al.*, 1995). Ao associarmos as características de adesão dos fibroblastos e da topografia do titânio, achamos mais conveniente inicialmente trabalharmos com adesão de fibroblastos sobre discos de titânio usinados e polidos, sem tratamentos por adição e/ou subtração.

Segundo Richards, 1996, promover a adesão dos fibroblastos ao biomaterial pode ajudar na integração do tecido conectivo mole ao implante, adicionando vascularização à superfície deste, diminuindo a chance de encapsulamento fibroso e infecção bacteriana. Esta preocupação é compartilhada neste estudo, que também utiliza fibroblastos, e superfície de titânio em condições semelhantes às dos abutments usados na clínica diária.

Outro motivo para a utilização do titânio na forma de discos se deve a fato das células espriarem mais facilmente, além de facilitar a metodologia de visualização e contagem destas (Freshney RI 2000).

Inicialmente, durante piloto do experimento, o tempo de cultura sobre os discos foi superior a três horas, inviabilizando o procedimento de desprendimento das células por centrifugação. Estes tempos foram sendo diminuídos até 15 min, sendo que nesta condição o número de células sobre os discos, após a centrifugação, chegava próximo a zero. Sendo assim, o tempo de cultura estabelecido foi de 27 minutos. A definição do tempo mínimo de 15 minutos foi realizada seguindo as informações de García et al, 1997, García et al., 1998 e Gallant et al., 2005,

Pelos resultados obtidos podemos verificar que a metodologia empregada permite uma análise qualitativa da adesão, além de uma comparação dos grupos analisados.

Analisando o gráfico 5.1, fica clara a diferença entre a quantidade de células por áreas analisadas antes e após o processo de centrifugação. A princípio esta colocação parece bastante óbvia, mas devido ao ineditismo do dispositivo utilizado esta primeira comparação se fez necessária. Estes resultados demonstram claramente que uma força centrífuga de 600G é capaz de desprender as células de fibroblasto dos discos de titânio. Estes resultados demonstram a biocompatibilidade do titânio, pela sua inatividade biológica, denominada de “indiferença biológica” devido ao fato de que os sinais da presença do metal não influenciam os tecidos. (Williams 1994).

A comparação entre os grupos, considerando-se os tratamentos da superfície de titânio, merece considerações. Mesmo o resultado do teste estatístico ANOVA (tabela 5.5) não ter sido considerado significativo a hipótese de nulidade foi rejeitada pelo pequeno número de repetições realizados associado à proximidade de significância entre o pré-estabelecido e o encontrado. Como neste experimento existe a dificuldade de padronização de alguns parâmetros, principalmente pela escassez de literatura pertinente e ineditismo do mecanismo utilizado.

O gráfico 5.2 permite verificar diferenças entre a cultura celular sobre os discos usinados e polidos, sendo que os polidos permitiram maior crescimento celular nos períodos de 27 minutos. Estes achados vêm de encontro com .(Richards,1996 Walboomers et al 1998) que relatam uma maior predileção dos fibroblastos por superfícies mais lisas. Pelo fato da superfície usinada ser mais irregular do que a polida, temos resultados semelhantes aos de Boyan et al.,1996; Chu PK, Chen JY, Wang LP *et al.*,.2002.

Na comparação entre as superfícies dos discos, após o processo de centrifugação, as superfícies polidas e usinadas obtiveram valores de células nos quadrantes semelhantes. Apesar disto não podemos deixar de verificar que os discos usinados (controle), após o tempo de cultura, tinham menor número de células do que os polidos (controle). Isto em razão da qualidade de adesão, a adesão fraca que não foi capaz de acontecer nos discos usinados. Os discos usinados aceitam adesão mais forte e os discos polidos aceita adesão mais fraca.

Estes resultados levam à suposição de que a adesão celular sobre a superfície de titânio se apresenta proporcional ao tempo de cultura celular. Já, se compararmos os resultados com os testes piloto de tempo de cultivo de uma hora, em que não houve desprendimento celular, independentemente da superfície de

titânio, esta suposição passa a ser mais bem suportada. Tempos maiores de cultivo levam a uma maior estruturação celular em relação à adesão ao substrato.

Esta suposição, colocada anteriormente, pode ser suportada em parte pelos resultados de Bowers et al. (1992), que sugerem que o tipo de rugosidade produzida sobre superfície de Ti cp afeta a resposta biológica inicial, tal como a aderência celular. Novos estudos, avaliando os tempos de cultura em relação à produção e atividade das moléculas de adesão podem esclarecer melhor esta relação.

7. CONCLUSÕES

Pela metodologia empregada e análise dos resultados foi possível concluir que:

- O método de centrifugação utilizado é eficiente para avaliar o processo de adesão celular;

- A topografia da superfície de titânio influencia na adesão de fibroblastos L929;

- As superfícies de titânio apresentam adesão celular iguais após as centrifugações;

8. REFERÊNCIAS¹

Adell R, Lekholm U, Röckler B, Bränemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. *Int J Oral Surg* 1981; 10:387-416.

Albrektsson T, Dahle E, Enbom L. Osseointegrated Oral Implants: A Swedish multicenter study of 8139 consecutively inserted Nobelpharma implants. *J Periodontol* 1988; 59:287-96.

Albrektson, 1985). Albrektsson T "The response of bone to titanium Implants", *Crit. Rev. Biocompatibility*, 8: 53-84, 1985.

American Type Culture Collection: Catalogue of Cell Lines & Hybridomas. 8th ed. Rockville, 1994).

Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufrene E, Judas D, Iost A, Hardouin P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughness. *J Biomed Mater Res* 2000;49:155-166.

American Society For Testing And Materials (ASTM): Standard specification for unalloyed titanium for surgical implant applications. Designation: F67-95. Annual book of ASTM standards. Medical devices and services, v.13.01 : 1, 1997.

Baxter LC.; Frauchiger Rauchiger V.; Textor M.; Ap Gwynn I.; Richards R.G. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. *Eur Cell Mater*, v.4, p.1-17. 2002.

Boyan BD.; Batzer R.; Kieswetter K; Liu Y; Cochran D.L.; Szmuckler M S.; Dean D.D.; Schwartz Z. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.39, n.1, p.77-85, 1998.

Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral & Maxillofac Implants* 1992; 7(3):302-310.

¹ De acordo com estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos Segundo base de dados MEDLINE

Branemark PI, Adell R, Albrektsson T, Lekholm U, Lindstrom J, Rockler B. An experimental and clinical study of osseointegrated implants penetrating the nasal cavity and maxillary sinus. *J Oral Maxillofac Surg.* 1984 Aug;42(8):497-50.

Branemark, PI.; Hansson B.O.; Adell R.; Breine U.; Lindstron J.; Hallen O.; Öhman A. Osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. Experience from a 10 year period. *Scand. J. Plast. Reconstr.Surg.*, v.16, p.1-132, 1977.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. *et al* Influence surface characteristics on bone integration of titanium implants: a histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1991; 25(7):889-902.

Chan PC, Chen SY, Chen CH, Chen HC ; Crosstalk between hepatocyte growth factor and integrin signaling pathways. *J Biomed Sci.* 2006 Feb 23

Chehroudi, B.; Gould T.R.L.; Brunette D.M. Titanium-coated micromachined grooves of different dimensions affect epithelial and connective tissue cells differently in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.24, n.9, p.1203-1219, 1990.

Chu PK., Chen JY., Wang LP et al., "Plasma-surface Modification of Biomaterials", *Materials Science and Engineering Review*, v. 36, n. 5-6, pp. 143-206, Mar. 2002.

Contran, R.S.; Kumar R.; Collins T. *Ranchura e adesão celular Patologia estrutural e funcional*, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2000.

Cooper LF, Masuda T, Yliheikkila PK, Felton DA. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:163-74.

Cooper LF. Biologic determinants of bone formation for osseointegration: clues for future clinical improvements. *J Prosthet Dent* 1998; 80(4):439-449.

Cooper, LF. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent* 2000 Nov; 84(5):522-34.

Cox JF, Zarb GA. The longitudinal clinical efficacy of osseointegrated dental implants: A 3-year report. *Int J Oral Maxillofac Impl* 1987;2:91-100.

Garcia, A.J., Huber, F., and Boettiger, D., (1998) Force required to break $\alpha 5 \beta 1$ integrin-fibronectin bonds in intact adherent cells is sensitive to integrin activated state, *J. Biol.Chem.* 273: 10988-10993.

Davies J.E. In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat. Rec.*, v.245, n.2, p.426-445, 1996.

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

Derhami, K., J. F. Wolfaardt, A. Wennerberg, and P. G. Scott. 2000. Quantifying the adherence of fibroblasts to titanium and its enhancement by substrate-attached material. *J. Biomed. Mater. Res.* 52:315-322.

Elias CN, “Limpeza e preparação da Superfície dos Implantes Osseointegráveis Master Screw”, *Rev Bras de Implantodontia*, 5, 2, 10-12, 1999.

Gallant ND, Michael KE, García AJ. Cell adhesion strengthening: contributions of adhesive area, integrin binding, and focal adhesion assembly. *Mol Biol Cell.* 2005 Sep;16(9):4329-40. Epub 2005 Jul 6.

Gallant ND, García AJ. Cell Model of integrin-mediated cell adhesion strengthening. *J Biomech.* 2007;40(6):1301-9. Epub 2006 Jul 7.

Garcia, A.J., Ducheyne, P., and Boettiger, D. (1998a). The effect of surface reaction stage on fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass. *J. Biomed. Mater. Res.* 40, 48–56.

Garcia, A.J., Huber, F., and Boettiger, D. (1998b). Force required to break $\alpha 5\beta 1$ integrin-fibronectin bonds in intact adherent cells is sensitive to integrin activation state. *J. Biol. Chem.* 273, 10988–10993.

Garcia, A.J., Schwarzbauer, J, and Boettiger, D. (2002) Distinct activation states of $\alpha 5\beta 1$ integrin show differential binding to RGD and synergy domains of fibronectin. *Biochemistry* 41, 9063-9069.

Greenwood NN, Earnshaw A. *Chemistry of the Elements* 2nd ed; Leeds, U.K. Butterworth Heinemann.1998;chapter 21.

De Groot K. (1998), “Calcium Phosphate Coatings: Alternatives do Plasma Spray”, *Bioceramics*, New York, v. 11, p. 41-44

Ioachim E.; Chachanti A.; Briasoulis E.; Karavasilis V.; Tsanou H.; Arvanitis D.L.; Agnantis N.J.; Pavlidis N. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *European Journal of Cancer*, 2002, v. 38, p. 2362-2370.

Derhami K; JF. Wolfaardt JF. Wennerberg A , Scot P G. Quantifying the adherence of fibroblasts to titanium and its enhancement by substrate-attached material *Journal of Biomedical Materials Research* Volume 52, Issue 2 , Pages 315 – 322.

Kasemo B.; Lausmaa, J. Metal selection and surface characteristics. In Bränemark PI, Zarb G A, Albrektsson T. Tissue - integrated prostheses osseointegration in clinical dentistry Chicago, Quintessenz. Cap 4, p. 99-116 1987.

Keller J.C., Draughn RA., Wightman JP. Dougherty W. J Meletiou S.D Characterization of sterilized cp titanium Implant surfaces. International Journal of Maxillofacial Implants, v. 5, p. 360-367, 1990.

Kumari T. V.; Vasude , U.; Kumar A.; Menon B. Cell surface interactions in the study of biocompatibility. Trends in biomaterials and artificial organs , v.15, n.2, p.37-41. 2002.

Lausmaa J, Kasemo B, Mattsson H, Odellius H Multi-technique surface characterization of oxide film on electropolished and anodically oxidized titanium Appl Surface Sci 1990; 45: 189-200.

Majeska RJ. Culture of osteoblastic cells. In Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Principles of bone biology . San Diego: Academic Press; 1996; chapter 89:1229-1237.

Michaels CM, Keller JC, Stanford CM, Solursh M. In vitro cell attachment of osteoblast-like cells to titanium. J Dent Res 1989;68:276.

Misch CE Contemporary implant dentistry, Mosby, St 1999.

Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schaub DM, Simpson J, Lankford Jr J. *Et al.* Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). J Biomed Mater Res 1995; 29(3):389-401.

Molecular and Biomechanical Characterization of Mineralized Tissue by Dental Pulp Cells on Titanium
Nakamura H, L. Saruwatari, H. Aita, K. Takeuchi, and T. Ogawa*
J Dent Res 84(6):515-520, 2005.

Ong L, Prince CW, Raikar GN, Lucas LC. Effects of surface topography of titanium on surface chemistry and cellular response. Implant Dent 1996; 5:83-88.

Pan H.; Jiang H. L.; Chen W. L. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-glycolide. Biomaterials, v.27, n.17, p.3209-3220. 2006.

Pellenc, D. (2005), Auto-assemblage de la fibronectine induit par l'adsorption: caractérisation expérimentale sur l'hydroxyapatite et étude par simulation numérique, Ph. D. Thesis, University of Cergy-Pontoise, Cergy-Pontoise, France.

Pilla RM. Weatherly JC .Developments in implant alloys.CRC Crti Rev Biocompatibility 1986;1:371-403.

Rae T. Cell biochemistry in relation to the inflammatory response to foreign materials, In: Fundamental Aspects of Biocompatibility. Williams DF, ed. . p.159-181. 1981.

Richards RG. The effect of surface roughness on fibroblast adhesion in vitro. Injury-International Journal of the Care of the Injured, v.27, p.38-43. 1996.

Serrano M C.; Pagani R.; Vallet-RM.; Pena J.; Ramila A.;Izquierdo I.; Portoles M. T. In vitro biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. Biomaterials, v.25, n.25, p.5603-5611. 2004

Schneider G.; Burrige K. Formation of focal adhesions by osteoblasts adhering to different substrata. Exp. Cell Res., v.214, n.1, p.264-269, 1994.

Schwartz Z; Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. J. Cell Biochem., v.56, n.3, p.340-347, 1994.

Verrier S.; Barrielle R.; Rovira A.; Dard M.; Amedee J. Human osteoprogenitor responses to orthopaedic implant: Mechanism of cell attachment and cell adhesion. Journal of Materials Science-Materials in Medicine , v.7, n.1, p.46-51.1996.

Walboomers XF, Croes HJ, Ginsel LA, Jansen JA. Growth behavior of fibroblasts on microgrooved polystyrene. Biomaterials. 1998;19:1861–1868.

Wang J, Milner R.Fibronectin promotes brain capillary endothelial cell survival and proliferation through alpha5beta1 and alphavbeta3 integrins via MAP kinase signalling. J Neurochem. 2006 Jan;96(1):148-59

Wennerberg A.; Albrektsson T.; Andersson B. Design and surface characteristics of 13 commercially available oral implant systems. Int. J. Oral Maxillofac. Implants, v.8, n.6, p.622-633, 1993.

Wennenberg A.; AlbrektssonL T.; Anderson B.; KrollJJ. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three diferent surface topographies. Clin. Oral Implants Res., v.6, n.1, p.24-30, 1995.

Wennerberg A, Albrektsson T, Anderson B , “An animal study of cp Ti screws with different surface topographies”, J Mat Sc Materials: in Medicine, 6, 302-309, 1995.

Williams DF. Titanium: epitome of biocompatibility or cause of concern. *J. Bone Joint Surg Br* 1994;76(3):348-9.

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](#)