

SANDRA DE CARVALHO FABIANO ALVES

AVALIAÇÃO “*IN VITRO*” DA ADESÃO E
PROLIFERAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS SOBRE
IMPLANTES OSSEOINTEGRÁVEIS COM SUPERFÍCIE
USINADA (TITAMAX LISO[®])

Dissertação apresentada ao Centro de
Pós-Graduação / CPO São Leopoldo
Mandic, para obtenção do grau de Mestre
em Odontologia.

Área de concentração: Implantodontia

CAMPINAS
2006

SANDRA DE CARVALHO FABIANO ALVES

AVALIAÇÃO “*IN VITRO*” DA ADESÃO E
PROLIFERAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS SOBRE
IMPLANTES OSSEOINTEGRÁVEIS COM SUPERFÍCIE
USINADA (TITAMAX LISO[®])

Dissertação apresentada ao Centro de
Pós-Graduação / CPO São Leopoldo
Mandic, para obtenção do grau de Mestre
em Odontologia.

Área de concentração: Implantodontia

Orientador: Prof. Dr. Thomaz Wassall

CAMPINAS
2006

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca "São Leopoldo Mandic"

Alves, Sandra de Carvalho Fabiano.
Al47a4 Avaliação "in vitro" da adesão e proliferação de osteoblastos sobre implantes osseointegráveis com superfície usinada (Titamax Liso®) / Sandra de Carvalho Fabiano Alves. – Campinas: [s.n.], 2006.
77f.: il.

Orientador: Thomaz Wassall.
Dissertação (Mestrado) – C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação.

1. Titânio. 2. Teste de cultura de células. 3. Teste de cultura de materiais. 4. Implantes dentários. I. Wassall, Thomaz. II. C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação. III. Título.

*C.P.O. - CENTRO DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS
SÃO LEOPOLDO MANDIC*

Folha de Aprovação

A dissertação intitulada: “AVALIAÇÃO “IN VITRO” DA ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE OSTEOBLASTOS SOBRE IMPLANTES OSSEOINTEGRÁVEIS COM SUPERFÍCIE USINADA (TITAMAX LISO®)” apresentada ao Centro de Pós-Graduação, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração: _____ em __/__/____, à comissão examinadora abaixo denominada, foi aprovada após liberação pelo orientador.

*Prof. (a) Dr (a) Thomaz Wassall
Orientador*

*Prof. (a) Dr (a)
1º Membro*

*Prof. (a) Dr (a)
2º Membro*

DEDICATÓRIA

AOS MEUS PAIS **MÁRIO** E **IRENE**, RESPONSÁVEIS PELA MINHA
FORMAÇÃO MORAL, ESPIRITUAL E INTELECTUAL.

AO MEU MARIDO **MANUEL**, PELO COMPANHEIRISMO, AMOR E
INCENTIVO INCONDICIONAL.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, meu escudo e meu baluarte, por ter ouvido minhas preces sempre que precisei e por ter me dado força no cumprimento de minhas tarefas.

Agradeço ao meu orientador, **Prof. Dr. Thomaz Wassall**, pelo apoio, confiança e incentivo à minha carreira acadêmica. Meu respeito e gratidão.

Agradeço a todos os professores do meu Curso de Mestrado, com quem tive o prazer e satisfação de conviver e aprender.

Agradeço à Prof^a Dra. Andréa Mantesso, pela atenção, paciência, competência e dedicação na elaboração do meu experimento.

Agradeço ao Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr., pela sua cordialidade e atenção durante a utilização dos Laboratórios de Cultivo Celular e Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Agradeço ao Departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela utilização de seus laboratórios de Cultivo Celular e Microscopia Eletrônica de Varredura, o qual possibilitou a elaboração da minha Tese.

Agradeço a todos os meus colegas do Curso de Mestrado, pelo companheirismo e amizade fraterna que cultivamos na nossa caminhada.

Agradeço ao C.P.O. São Leopoldo Mandic, pela oportunidade dada para meu aperfeiçoamento profissional.

Agradeço à Neodent, pelos recursos dados para a realização deste trabalho.

Agradeço aos funcionários da São Leopoldo Mandic, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto.

**“Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende
o que ensina”.**
Cora Coralina

**“Os mais fortes requisitam apoio, a fim de que se
lhes acentue a resistência, os mais fracos
esperam auxílio para que não desfaleçam e os
mais cultos precisam de esclarecimento para que
a vaidade não lhes ensombre a cabeça”.**
Emmanuel

**“Existe uma única mágica, um único poder, uma
única salvação. chama-se amor”.**
Herman Hesse

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	11
RESUMO	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
3. PROPOSIÇÃO	53
4. MATERIAL E MÉTODO	54
4.1 Substrato	54
<i>4.1.1 Descrição do produto</i>	54
<i>4.1.2 Composição</i>	54
4.2 Cultivo celular	54
4.3 Preparo e análise das amostras	55
RESULTADOS	59
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÃO	70
ABSTRACT	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXO	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL ₂ O ₃	- Trióxido de alumínio
ALP	- Fosfatase alcalina
BIC	- Curva de integração óssea
BMP	- Proteína óssea morfogenética
BSP	- Sialoproteína óssea
Ca	- Cálcio
CaP	- Fosfato de cálcio
CSK	- Citoesqueleto intracelular
Tlcp	- Titânio comercialmente puro
DE	- Duplo ataque ácido
DMEM	- Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMS	- Dimetildiclorosilano
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
EDS	- Espectroscopia de energia dispersiva de raio X
EDTA	- Ácido etilenodiamino-tetracético
EP	- Eletropolido
FAK	- Kinase de adesão focal
FN	- Fibronectina
FTIR	- Espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier
GC	- Cerâmica de vidro
HBDC	- Células ósseas humanas
HVEM	- Microscopia eletrônica com transmissão de alta voltagem
H ₂ SO ₄	- Ácido sulfúrico

HA	- Hidroxiapatita
HCL	- Ácido clorídrico
HMDS	- Hexamethyldisilazano
HF	- Háfnio
HNO ₃	- Ácido nítrico
MBS	- Meio básico suplementado
MC3T3-E1	- Células de calvária de ratos recém-nascidos
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	- miligrama
MG-63	- Linhagem celular derivada de osteossarcoma humano
mHA	- Hidroxiapatita microporosa
ML	- Meio de lavagem
mM	- Milimolar
mRNA	- RNA (ácido ribonucléico) mensageiro
N cm ²	- Newtons por centímetro quadrado
OPN	- Osteopontina
OSTEO-1	- Linhagem celular de tecido ósseo parietal de ratos recém-nascidos
PBS	- Solução salina tamponada com fosfato
PCR	- Reação de polimerase em cadeia
PGE ₂	- Prostaglandina E ₂
pHA	- Hidroxiapatita não porosa
R _a	- Rugosidade
RBM	- Célula de medula óssea de ratos
RGD	- Sigla para seqüência de aminoácidos arginina, glicina e aspartina
RNA	- Ácido ribonucléico
SaOS-2	- Linhagem celular derivada de osteossarcoma humano

SL	- Jateamento com partículas grandes
SMP	- Jateamento com partículas médias
SLA	- Jateamento com partículas grandes seguidas por ataque ácido
SS	- Simplesmente usinadas
TGF- β	- Fator de crescimento transformador- β
TiAL ₆ V ₄	- Liga de titânio, com 6% de alumínio e 4% de vanádio.
Ti	- Titânio
Ti Ni	- Liga de titânio e níquel
TiO ₂	- Dióxido de titânio
TiO ₃	- Trióxido de titânio
TPS	- Jateamento com plasma de titânio
U2OS	- Linhagem celular derivada de osteossarcoma humano
VN	- Vitronectina
XRD	- Difractometria de raios X
ZrO ₂	- Óxido de zircônio
α -MEM	- Meio essencial mínimo- α
μ g	- Micrograma
μ m	- Micrômetro

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Implantes fixos por fio ortodôntico nº 9.....	56
FIGURA 2 - Amostras recobertas com camada de ouro (20nm) pela técnica de Sputtering..	57
FIGURA 3 - Microscópio Eletrônico de Varredura – LEO 430.....	57
FIGURA 4 - Amostras dispostas no MEV.....	58
FIGURA 5 - Processo Varredura para a obtenção de fotomicrografias.....	58
FIGURA 6 - Topografia da superfície de Ti avaliada em menor aumento (50x).....	60
FIGURA 7 - Topografia da superfície de Ti avaliada em maior aumento (400x).....	60
FIGURA 8 - MEV-24 hs com- imagem panorâmica do implante de Ti usinado 24hs (50x).....	61
FIGURA 9 - MEV- 24 hs com células Osteo-1 aderidas à superfície de Ti usinada, demonstrando uma orientação anisotrópica (100x).	61
FIGURA 10 - MEV-24 hs com células Osteo-1 aderidas à superfície de Ti usinada (218 x).....	62
FIGURA 11 - MEV- 48hs, aspecto morfológico das células Osteo-1 (400 x).	62
FIGURA 12 - MEV-72 hs, células com corpo grande e plano, espalhadas e proliferadas sobre a superfície de Ti usinada (400 x).....	63
FIGURA 13 - MEV-72 hs, imagem panorâmica de células Osteo-1 proliferadas	63

RESUMO

Estudos preliminares têm demonstrado que a adesão de células às superfícies de titânio é um fenômeno importante na área da Implantodontia Oral. Atualmente, a consideração maior no planejamento do desenho de um implante tem sido a produção de superfícies biocompatíveis, que promovam respostas favoráveis nas células e nos tecidos do hospedeiro. A adesão, proliferação e diferenciação dos osteoblastos ao redor dos implantes tem sido objeto de inúmeros trabalhos “*in vitro*” e “*in vivo*”, demonstrando que diferentes tratamentos de superfície podem modular a expressão fenotípica e o metabolismo de células osteoblásticas. O objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento “*in vitro*” de células parietais de ratos recém-nascidos (Osteo-1), cultivadas sobre implantes, comercialmente disponíveis, com superfície de titânio usinada. Três amostras de implantes foram imersas em suspensão de células osteoblásticas. Após 24, 48 e 72 horas de cultivo, uma amostra de cada grupo foi preparada para análise ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Os resultados indicaram que o implante analisado permitiu a adesão e a proliferação celular durante o período estudado. Em nosso experimento, a superfície usinada analisada permitiu uma resposta favorável ao comportamento osteoblástico “*in vivo*”, apesar de a literatura demonstrar uma superioridade das superfícies rugosas, no que se refere à adesão e proliferação dos osteoblastos. Pudemos concluir que em nosso experimento, o implante estudado apresentou uma superfície biocompatível, pois preservou a integridade das células cultivadas, mantendo suas características morfológicas. Pudemos também concluir que as células Osteo-1 utilizadas nesta pesquisa, demonstraram um comportamento anisotrópico com afinidade pelas ranhuras oriundas do processo de usinagem da superfície dos implantes de titânio.

Palavras-chave: Superfície de implante. Titânio. Biocompatibilidade. Cultura de células.

1. INTRODUÇÃO

BRÅNEMARK (1959), em uma série de estudos começados em 1952, introduziu as bases biológicas da Osseointegração. Estes estudos se iniciaram no Laboratório de Microscopia Vital da Universidade de Lund e a partir de 1960, no Laboratório de Biologia Experimental da Universidade de Gotemburgo, Suécia.

Os estudos na área da implantodontia se expandiram rapidamente nos últimos quarenta anos. A base para este grande número de estudos tem sido o reconhecimento de que a implantodontia pode alcançar altos índices de sucesso (ALBREKTSSON *et al.*, 1986). Além disso, sabe-se que as respostas biológicas à superfície dos implantes nas fases primárias da osseointegração são de fundamental importância para o sucesso clínico dos implantes (KIESWETTER *et al.*, 1996).

A grande maioria dos implantes utilizados é de titânio. Entretanto, uma grande variedade de tratamentos de superfície deste material tem sido estudada e aplicada. Uma das superfícies mais documentadas e pesquisadas é a superfície de titânio usinada (BRÅNEMARK, 1985).

Um dos principais objetivos da implantodontia contemporânea é o desenvolvimento de artifícios que induzam a uma reparação óssea rápida, guiada e controlada (PULEO & NANJI, 1999). Uma das opções para se obter melhores resultados na osseointegração seria a otimização das superfícies de titânio (CASTELLANI *et al.*, 1999). Isto poderá ser alcançado pela compreensão dos efeitos das características de superfície dos implantes, no que se refere às respostas biológicas iniciais nas superfícies de titânio, como a adesão, proliferação e diferenciações celulares e produção de matriz extracelular (TER BRUGGE *et al.*,

2002).

As superfícies de implantes têm sido avaliadas por meio de experimentos “*in vivo*” e “*in vitro*”, examinando o grau de contato entre a superfície de titânio e o tecido ósseo (CASTELLANI *et al.*, 1999). Além disso, as propriedades da superfície de titânio tais como a pureza química da sua camada de óxido e o grau de limpeza da sua superfície, são de vital importância para se conferir a propriedade de biocompatibilidade ao biomaterial e para se alcançar o resultado biológico da osseointegração (KASEMO & LAUSMAA, 1988)

Os modelos de cultura celulares e a análise das mesmas ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), oferecem as condições necessárias para se investigar aspectos relacionados à adesão de células ósseas na superfície de titânio e também a grande quantidade de eventos celulares oriundos desta adesão (SENNERBY *et al.*, 1993). No presente trabalho, observamos a adesão e proliferação de uma linhagem celular originada do tecido ósseo parietal de ratos recém-nascidos (Osteo-1) na superfície de implantes usinados, submetidos à cultura, por um período de 24 a 72 horas e analisamos o comportamento celular ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

2. REVISÃO DA LITERATURA

BRÅNEMARK *et al.* (1969) realizaram experimentos em cães e estas pesquisas tinham como objetivo permitir o desenvolvimento de procedimentos reconstrutivos para o tratamento de defeitos nos maxilares, bem como os estágios avançados de edentulismo total. Com este propósito, foram extraídos os pré-molares de cães e substituídos por implantes de titânio com o formato de parafusos. Próteses fixas foram conectadas após um período de reparação de três a quatro meses sem carga, após a conexão de pilares intermediários, sendo que a capacidade de ancoragem dos implantes isoladamente era de 100 kg na mandíbula e de 30 a 50 kg na maxila. Os esforços para a extração dos implantes levaram à fratura óssea em áreas distantes das interfaces. Os resultados revelaram, por meio de análises radiográficas, que havia ocorrido uma remodelação óssea ao redor do implante e nas análises histológicas, verificou-se a formação de tecido ósseo em íntima relação com os implantes. Os dados obtidos neste modelo de estudo em animais permitiram a constatação de que a ancoragem direta de um implante no tecido ósseo era possível, desde que um protocolo definido fosse estabelecido e seguido.

ADELL *et al.* (1981) publicaram um estudo longitudinal iniciado no ano de 1965 em Gotemburgo, que visava a avaliação dos resultados clínicos com aplicação da técnica de osseointegração em humanos. De 1965 a 1980, 2.768 fixações foram instaladas em 410 maxilas e mandíbulas com edentulismo total, em 371 pacientes consecutivos. As técnicas cirúrgicas e protéticas foram desenvolvidas e avaliadas a partir de um estudo piloto, por um período de cinco anos. Os resultados dos procedimentos padronizados foram aplicados em material clínico obtido pela observação de cinco a nove anos. Neste grupo, 130 maxilas e mandíbulas foram

tratadas com 895 fixações e destas, 81% das fixações maxilares e 91% das mandibulares permaneceram estáveis suportando as próteses. Em 89% dos casos maxilares e 100% dos mandibulares, as próteses permaneceram estáveis. Durante a reparação e o primeiro ano após a instalação das próteses, o valor médio de perda óssea foi de 1,5mm. Após este período, apenas 0,1 mm foi perdido anualmente. Os resultados obtidos permitiram que fosse criado um protocolo para a instalação de implantes osseointegráveis em humanos

WILLIAMS (1981), em um trabalho de revisão sobre o uso comercial de titânio, disse que o primeiro relato da descoberta do elemento titânio foi atribuído a Wilhelm Gregor, um mineralogista amador no ano de 1791. Passaram-se 150 anos para que o titânio se tornasse um metal disponível para utilização industrial, principalmente devido à dificuldade do processo de extração do titânio dos minerais. Somente a partir das décadas de 1930 e 1940, tornou-se possível realizar o processamento comercial do metal. O autor concluiu que por apresentar apenas 60% do peso do aço, excelentes propriedades mecânicas como resistência à corrosão e às variações de temperatura, além de permitir sua manufatura nas mais diversas formas requeridas, o metal puro e suas ligas estão sendo utilizados tanto nas indústrias aeroespacial e química, bem como na confecção de implantes cirúrgicos.

RICH & HARRIS (1981) realizaram um estudo para observar a locomoção e a adesão celular sobre diferentes substratos. As células utilizadas neste experimento foram: células de peritônio de macrófagos de ratos brancos suíços e uma linhagem celular de fibroblastos de ratos (L₉₂₉). Após centrifugação, as células foram resuspensas em PBS e fixadas no substrato experimental por 15 a 20 minutos a 37°C antes de substituir a solução salina por meio de cultivo fresco, contendo

penicilina e estreptomicina, e suplementado com 10% de soro fetal bovino. Foram usados três substratos artificiais: a) discos de poliéster não submetido à tratamento; b) discos de poliéster tratados com ácido sulfúrico concentrado por duas horas para se fazer um substrato hidrofílico e c) paládio evaporado em poliéster tratado e não tratado. Foram também criados substratos de poliéster rugosos por discos de polimento com acabamento grosso e estas superfícies rugosas foram facilmente visíveis no microscópio de fase invertida. As culturas foram observadas ao microscópio e fotografadas com câmera de 35 mm. Os resultados demonstraram que os macrófagos se acumularam mais em poliéster não tratados em relação ao paládio e mais no paládio do que em poliéster sulfonado. Os fibroblastos migraram preferencialmente para uma seqüência oposta dos macrófagos, demonstraram preferência por substratos mais hidrofílicos. Os macrófagos também se acumularam preferencialmente em superfícies rugosas ao contrário dos fibroblastos que mostraram afinidade por superfícies lisas. As preferências opostas dos dois tipos de células permitiram a observação de que a textura e a topografia de superfície de um substrato influenciam o comportamento celular em modelos de estudo “*in vitro*”.

ALBREKTSSON *et al.* (1981), como objetivo de preencher uma lacuna freqüente na literatura em relação ao complexo problema multidimensional associado com a instalação de um elemento estranho ao corpo, estabeleceram critérios para a avaliação de uma série de fatores que deveriam ser controlados para se promover a osseointegração. Concluíram que os principais fatores a serem observados deveriam ser: a) a biocompatibilidade do material de implante; b) a natureza macroscópica e microscópica da superfície do implante (desenho do implante); c) o estado do leito cirúrgico; d) a técnica cirúrgica utilizada; e) a fase de cicatrização sem perturbações; f) o desenho da prótese e as cargas aplicadas ao

implante em longo prazo.

ZARB (1982) publicou uma ata da Conferência de Toronto sobre Osseointegração Clínica com o objetivo de divulgar a aceitação pela comunidade científica internacional, reforçada pela aceitação da Associação Americana de Odontologia, de um sistema de implante desenvolvido por Brånemark e seus colaboradores suecos. A publicação concluiu que um sistema de implante dentário que veio embasado por um protocolo controlado e com pesquisas longitudinais cientificamente comprovadas preenchia os critérios necessários para a utilização na Odontologia Clínica.

ALBREKTSSON (1985), em uma revisão sobre a biocompatibilidade do titânio, relatou que existem diferenças mecânicas entre os diferentes graus de pureza do titânio (Ti), devido a contaminantes presentes em quantidades mínimas. Relatou que traços de outros elementos como nitrogênio, carbono, hidrogênio e ferro poderiam ser adicionados para melhoramentos das propriedades mecânicas e físico-químicas dos implantes.

BRANEMÅRK (1985) por meio da publicação de um livro com o objetivo de expor toda a sua pesquisa para elucidar o fenômeno da osseointegração concluiu que poderia conceituar o fenômeno como sendo “uma conexão estrutural e funcional direta do tecido vivo e ordenado e a superfície de um implante submetido às cargas funcionais”.

KASEMO & LAUSMAA (1985) afirmaram que, independentemente do material que se escolha para a confecção dos implantes, será sua superfície que entrará em contato com o tecido receptor. No caso do titânio, o que entra em contato com o tecido ósseo é o óxido de titânio, e não o titânio totalmente puro, pois segundo os autores, assim que o implante entra em contato com as moléculas de

oxigênio presentes no meio ambiente, em um espaço de 10 nanossegundos, forma-se a primeira camada monoatômica de oxigênio. Em um espaço de tempo próximo de um milésimo de segundo, a espessura desta camada pode, no caso do titânio, chegar a 1 nm de espessura, adquirindo rapidamente uma camada entre 3 a 5 nm à temperatura ambiente. O titânio pode formar numerosos óxidos, sendo que o mais comum é dióxido de titânio (TiO_2) muito resistente ao ataque químico, fazendo com que seja um dos metais mais resistentes à corrosão. Afirmaram também que esta camada de óxido pode ser altamente protetora e que, na realidade, nunca se estabelece um contato direto entre o metal que constitui o implante e o tecido receptor, mas sim entre o tecido e o óxido de superfície do implante. Devido ao fato de o óxido ter propriedades químicas diferentes do titânio, o parâmetro pertinente de discussão sobre biocompatibilidade, do ponto de vista químico, é a biocompatibilidade do óxido. Em relação à aspereza da superfície, acreditavam que numa escalada com valores de 100nm para cima, uma superfície pode ser vantajosa do ponto de vista mecânico, porque pode oferecer distribuição apropriada da tensão no entanto, superfícies muito desiguais ou porosas apresentam uma desvantagem quando ocorre dissolução de íons de metal, porque a zona total exposta e, portanto, a quantidade de metal em dissolução será maior. Na prática, a superfície dos implantes terá, quase sempre, uma aspereza considerável na escala nanométrica. Os autores concluíram que as propriedades físicas e químicas básicas são iguais em uma escala molecular, independentemente se a superfície é rugosa ou não, porém espera-se que a adesão de grandes agregados, como as células, sejam influenciada pela aspereza da superfície.

THOMAS & COOK (1985) desenvolveram um estudo para avaliação de a três variáveis: módulo de elasticidade, textura de superfície e composição da

superfície do matéria em relação à osseointegração. Obtiveram resultados na resposta óssea mediante estas variáveis, utilizando implantes colocados em cães. Foram utilizados 12 tipos de implantes em forma de cilindros medindo 6 mm de diâmetro e 16 de comprimento, compostos de quatro tipos de materiais: polimetilmetacrilato, carbono pirolítico com baixa temperatura isotrópica, titânio comercialmente puro (cp Ti) e óxido de alumínio (AL_2O_3). A textura de superfície destes quatro grupos foi variada utilizando-se dois métodos; polidos e jateados. Os implantes foram instalados transcorticalmente em fêmures de Cães mestiços adultos e os animais foram sacrificados após um período de 32 semanas. A seguir testes de remoção mecânica foram realizados para determinar a força e a rigidez de cisalhamento na interface osso-implante. Os resultados indicaram que para implantes fixados por aposição óssea direta, a força e a rigidez de cisalhamento na interface não foram afetadas por duas variáveis: módulo de elasticidade e composição da superfície do implante. No entanto, variando a textura de superfície, a resposta óssea na interface osso-implante foi significativamente alterada. Avaliações histológicas demonstraram que implantes com superfície rugosa exibiram aposição óssea direta, enquanto os lisos exibiram vários graus de tecido fibroso envolvendo-os. Os autores concluíram que das três variáveis estudadas, a que influenciou uma resposta mais favorável à osseointegração foi a textura de superfície dos implantes.

ALBREKTSSON *et al.* (1986) publicaram um trabalho observado até hoje pelos profissionais da área da Implantodontia, com o objetivo de estabelecer novos “critérios de sucesso” para manutenção dos implantes concluindo que seriam: a) que um implante permaneça imóvel quando testado clinicamente; b) que uma radiografia não apresente sinais de radiolucidez perimplantar; c) que a perda óssea vertical seja

menor que 0,2 mm anuais, ao primeiro ano de função; d) que a realização de cada implante seja caracterizada pela ausência de sinais irreversíveis e/ou persistentes tais como dor, parestesia ou violação do canal mandibular.

KASEMO & LAUSMAA (1988a) relataram em um artigo de revisão que o arranjo de átomos na superfície externa dos metais é diferente da disposição atômica do volume interno. Esta variação eleva o nível da energia de superfície, tornando-a com maior tendência a adsorver átomos e moléculas estranhas. Relataram ainda que a superfície do implante deve ser limpa química e mecanicamente para a remoção de qualquer partícula estranha como a limalha ou lascas de metal, utilizados na confecção de implantes. Concluíram que quanto maior a energia de superfície do metal, maior a probabilidade de ocorrer reações entre o hospedeiro e a superfície do material e que descontaminação da superfície é um fator preponderante para a integridade das células do leito receptor e conseqüente osseointegração.

KASEMO & LAUSMAA (1988b) publicaram um artigo sobre biomateriais e superfície dos implantes, mais especificamente sobre os aspectos microscópicos e os fenômenos que ocorrem na interface hospedeiro-implante. Afirmaram que as respostas biológicas que ocorrem em níveis celulares e microscópicos são uma conseqüência das interações em níveis moleculares. Por estas razões, o estado da superfície do implante é de importância central nas avaliações biológicas do implante. Para eles, as propriedades de superfície de interesse eram a composição química, micro e macroestrutura, contaminação e limpeza, e propriedades de interações da superfície em relação às biomoléculas. Em relação à textura de superfície, afirmaram que anatomicamente uma superfície lisa e outra rugosa provocam diferentes áreas de contato de biomoléculas e células e isto produz

diferentes tipos de uniões das unidades biológicas que podem influenciar a sua conformação e função.

CARLSSOM *et al.* (1988) realizaram um trabalho onde compararam a resistência de implantes osseointegráveis de TiCp com duas texturas de superfícies diferentes (lisa e rugosa), no que se refere à remoção por torque os eventos histológicos na interface osso e implante. Os implantes foram instalados em fêmures de seis coelhos, próximo à articulação do joelho. Um animal morreu por razões desconhecidas. Decorrido um período de seis semanas após a instalação dos implantes os animais foram submetidos à Eutanásia. Os resultados mostraram que, para a remoção, os implantes rugosos apresentaram valores significativamente superiores aos lisos. A força média para a remoção dos implantes rugosos foi de 26,4 N cm², enquanto que a média para os polidos foi de 17,2 N cm². As observações histológicas mostraram que ambos os implantes apresentaram-se ancorados diretamente ao osso sem interposição de tecidos moles. Os autores concluíram que apesar de implantes de titânio com superfície rugosa apresentarem uma força média para remoção maior, histologicamente ambos demonstraram capacidade de osseointegração.

BUSER *et al.* (1991) realizaram um estudo com o propósito de avaliar a influência de diferentes características de superfície dos implantes de titânio no processo de osseointegração. Cilindros ocos foram preparados com seis tipos de superfície: (1) Tipo E = eletropolido; (2) Tipo SMP = jateado com partículas médias (de 0,12 a 0,25 µm) e imersos em HF e HNO₃; (3) Tipo SL = jateado com partículas grandes (de 0,25 a 0,50 µm); (4) Tipo SLA = jateados com partículas grandes e atacados por ácido HCL e H₂SO₄; (5) Tipo TPS = jateados com plasma de titânio e (6) Tipo HP = jateado com HA. Setenta e dois implantes, 12 de cada tipo, foram

instalados em tíbias e fêmures de porcos. Todos apresentaram fixação primária e, as três e seis semanas, os implantes foram removidos e analisados em secções transversas descalcificadas. Os exames histomorfométricos revelaram diferenças significativas nas porcentagens de contato Osso-implante, quando medidas em osso esponjoso. Tanto os implantes de superfícies (Tipo E) quanto os de superfícies jateadas por ácido (SMP) tiveram as mais baixas porcentagens de contato osso-implante, com valores médios entre 20 e 25%. Implantes jateados com partículas grandes (Tipo SL) e com plasma de titânio (TPS) apresentaram em média 30 a 40% de contato ósseo. Os mais elevados índices de contato na interface entre osso e implante foram observados nas superfícies jateadas e atacadas por ácido (SLA), com média de valores de 50 a 60%. Os resultados dos estudos histomorfométricos demonstraram que as superfícies rugosas dos implantes apresentaram aumento da aposição óssea, quando comparadas com implantes Tipo E e SMP. O tratamento ácido com HCL e H₂SO₄ usado para a superfície SLA demonstrou um estímulo na aposição óssea. A cobertura com HA demonstrou as mais altas extensões de osso na interface com o implante, no entanto a cobertura de HA usada no estudo revelou sinais de reabsorção. Com base nestes dados, foi concluído que a extensão da interface osso e implante é relacionada com o aumento da rugosidade da superfície do implante e que estudos futuros serão necessários para determinar quais são as características necessárias para se obter uma ótima superfície nos implantes instalados em osso esponjoso.

WILLIAMS (1994) descreveu algumas propriedades que conferem a característica de biocompatibilidade a um material. De acordo com o autor, a resistência à corrosão é um pré-requisito para a biocompatibilidade de um material, embora ela não a garanta necessariamente. A reputação do titânio como um

material biocompatível foi baseada na sua excelente resistência à corrosão, a qual limita bastante a quantidade de íons liberados nos tecidos e na sua inatividade biológica, algumas vezes denominada “indiferença biológica” que lhe confere a característica de não influenciar qualquer parte dos tecidos. O autor definiu biocompatibilidade como “a habilidade de um material desempenhar uma função, em uma aplicação específica, com uma resposta apropriada”. Isto implica que um material pode demonstrar uma resposta inapropriada sob diferentes condições. A experiência com politetrafluoretileno ilustra esta possibilidade, visto que ele é ostensivamente o polímero mais inerte que existe e o seu uso no passado em cirurgia de reposição de quadril pela técnica de Charnley produziu uma intensa reação inflamatória. O autor concluiu que nenhum material é universalmente biocompatível e que o uso apropriado dos materiais é que pode promover altos índices de sucesso na sua aplicação.

INGBER *et al.* (1994) publicaram um artigo de revisão focado nos mecanismos que influenciam a regulação do crescimento celular e morfogênese. De acordo com os autores, determinantes químicos mediam a morfogênese, embora forças mecânicas exerçam um papel regulatório importante. A geração de tecidos no embrião requer diferenciação local no formato das células e o estabelecimento de estresse mecânico para que os tecidos possam se expandir. Estas transformações são dirigidas por forças tenseis que são geradas dentro do citoesqueleto. Os autores concluíram que estas forças são primordiais para locomoção celular e formação dos contatos focais necessários para a adesão e posterior proliferação celular.

KIPALDI & LEMONS (1994) publicaram um estudo para observar como a energia de superfície do titânio foi afetada por diferentes métodos de preparação de superfície. Foram utilizadas superfícies: polidas e usinadas (I); polidas ,usinadas,

não esterilizadas em calor seco e não passivadas (II); polidas, usinadas, passivadas por ácido nítrico a 30% por 20 minutos e esterilizadas em calor seco (III); cunhadas, polidas, passivadas e esterilizadas com calor seco (IV); cunhadas, passivadas, não polidas e esterilizadas com calor seco (V). Foram realizadas as mensurações do grau de umectabilidade das superfícies por meio da avaliação do ângulo de contato de um líquido (água) e a superfícies dos substratos. A umectabilidade da superfície é dependente da energia da superfície e influencia o ambiente fisiológico, o aumento da umectabilidade melhora a interação entre a superfície do implante e o ambiente biológico. O estudo desenvolvido permitiu a constatação de que as superfícies tratadas apresentaram uma maior energia de superfície, o que resultou em uma propriedade desejável para os implantes endoósseos.

STEFLIK *et al.* (1994) relataram neste estudo observações específicas quanto à natureza e processos relativos aos osteócitos nas circunvizinhanças das superfícies de implantes. As observações foram obtidas de uma série de seccionamentos de tecidos orais que suportavam implantes bucais submetidos à cargas funcionais por mais de um ano. O exame da morfologia dos osteócitos foi realizado por transmissão convencional e por Microscopia Eletrônica com transmissão de alta voltagem (HVEM). Foram instalados 72 implantes na região de pré-molares de 18 cães. Quarenta e oito implantes em 12 cães foram usados como pilares anteriores de ponte fixa por mais de 12 meses. A matriz mineralizada do osso de suporte estava diretamente fixada à superfície do implante ou estava separada do implante por uma estreita interface de matriz desmineralizada. Os osteócitos foram rotineiramente observados em íntima relação com a interface osso e implante. Os osteócitos apresentaram processos celulares em direção à superfície do implante por meio de canalículos. Os processos celulares relativos aos osteócitos foram

elucidados por meio de HVEM, a natureza destes processos foram examinadas do ponto de saída dos osteócitos até o término dos mesmos na interface do implante. Esta pesquisa sugeriu que avenidas de comunicação devem existir entre o implante e as células ósseas, fornecendo uma hipótese sobre a ação das forças biomecânicas e a osteogênese na interface do implante.

MARTIN *et al.* (1995) avaliaram o efeito da rugosidade de superfície com a finalidade de observar a diferenciação osteoblástica, proliferação e síntese de proteínas. Células MG63 foram cultivadas em discos de Ti preparados em cinco tratamentos de superfície diferentes. Todos os discos foram pré-tratados com ácido nítrico hidrófluorídrico e em seguida lavados (PT). Os discos PT foram também eletropolidos (EP); jateados com partículas finas, atacados com ácido clorídrico (HCL) e sulfúrico (H_2SO_4) e lavados (FA); jateados com partículas grossas, atacados com HCL e H_2SO_4 e lavados (CA) e ainda jateados com plasma de Ti (TPS) e como controle utilizou-se culturas de material plástico. A topografia de superfície foi avaliada por microscopia de campo escuro e MEV enquanto que a composição química foi mapeada usando energia de dispersão com análise de Raios-X e a distribuição elemental determinada usando Espectroscópio Eletrônico. O efeito da rugosidade nas células foi avaliado pela mensuração do número celular; pela incorporação de timidina pelo DNA; pela atividade de fosfatase alcalina; pela incorporação de uridina pelo RNA; pela incorporação de prolina por proteínas digestivas colagenólicas (CDP) e não colagenólicas (NCDP) e pela incorporação de sulfato pela proteoglicana. Os resultados das análises demonstraram que o número de células foi inferior em superfícies TPS e aumentado em EP, enquanto que o número de células nas outras superfícies foi equivalente às células da cultura de plástico (controle). A incorporação de timidina foi inversamente relacionada à

rugosidade de superfície e a atividade da fosfatase alcalina em células isoladas diminuiu com o crescimento da rugosidade, exceto na cultura em CA. Por outro lado, a atividade enzimática foi somente inferior em culturas sobre FA ou TPS. Estes resultados demonstraram que a rugosidade de superfície alterou a proliferação, diferenciação e produção de matriz pelos osteoblastos em estudos “*in vitro*”.

DEN BRABER *et al.* (1995) avaliaram a taxa de crescimento celular e a orientação celular em superfícies bem definidas, as quais receberam diferentes tratamentos de superfície. Foram utilizados dois substratos nesta pesquisa: silicone liso e silicone texturizado. O substrato texturizado possuía sulcos de superfície paralelos com a largura de 2.0, 5.0 e 10 μm . Subseqüentemente estes substratos foram deixados sem tratamento de superfície (NT), tratados por irradiação ultravioleta (UV), tratados por radiofrequência emitida por chama (RFGD) ou por tratados por ambos (UVRFGD). Após a caracterização do substrato, fibroblastos dermais de ratos foram cultivados em UV, RFGD e UVRFGD por um, três, cinco e sete dias. A comparação entre substratos UV e NT revelaram que o tratamento com UV não influenciou o ângulo de contato e a energia de superfície de substratos com topografia similares. Entretanto, o ângulo de contato dos substratos RFGD e UVRFGD foram significativamente menores do que os outros dois. A dimensão dos microeventos de superfície não influenciou as características de umectabilidade. Os experimentos de cultura celular revelaram que o crescimento dos fibroblastos dermais de ratos em superfícies UV foi menor do que em superfícies RFGD e UVRFGD. O exame no MEV demonstrou que os sulcos paralelos nos substratos com 2.0 μm e 5.0 μm de largura foram capazes de induzir um alinhamento e uma orientação celular mais fortes do que em superfícies com 10 μm . Os autores concluíram pela combinação de achados, que parâmetros físico-químicos como a

umectabilidade e energia de superfície influenciam o crescimento celular, mas não desempenham um papel primordial na forma e na orientação celular em superfícies rugosas.

WENNERBERG *et al.* (1995) investigaram a resposta óssea em um modelo de estudo em animais com o propósito de investigar os efeitos da textura de superfícies de implante de titânio sobre a aposição óssea e a remoção por torque. Os autores utilizaram dez coelhos machos brancos da nova Zelândia, entre nove e dez meses de idade. Foram utilizados sessenta implante de Tlcp com 6mm de comprimento e 3,75 mm de diâmetro instalados em fêmures dos coelhos.. Os implantes foram divididos em grupos: (grupo A) trinta implantes lisos, (grupo B) vinte implantes jateados com partículas de 25 μm de dióxido de titânio (TiO_2) e (grupo C) dez implantes jateados com partículas de 250 μm de trióxido de alumínio AL_2O_3). Após um períodos de 12 semanas os animais foram submetidos à Eutanásia e os resultados mostraram que foram necessários valores maiores para a remoção por torque dos implantes do grupo B (média de 35,4 N cm^2) seguidos pelo grupo C (média de 32,7 N cm^2) e comparados com os do grupo A (média de 28,6 N cm^2). A avaliação histomorfométrica demonstrou porcentagem mais alta de contato osso e implante nos implantes do grupo B quando comparados com os do grupo A. Os autores concluíram que os implantes com rugosidade de 1 a 1,5 μm apresentaram melhores respostas em relação à retenção (tração) óssea, assim como maior contato osso-implante em histomorfometria. Uma superfície criada por jateamento de partículas de 250 μm AL_2O_3 , levou à formação de uma superfície mais rugosa (2,11 μm), não se observando melhora na retenção dos implantes ao osso.

KIESWETTER *et al.* (1996) avaliaram em um estudo “*in vitro*” a produção local de fatores de crescimento e citocinas por células de uma linhagem de

osteossarcoma humano (MG-63) em superfícies de titânio. Células MG-63 foram cultivadas em discos de titânio com superfície lisa e com diferentes graus de rugosidade: eletropolidas (P), pré-tratadas com ácido nítrico e ácido clorídrico (PT), jateadas com granulação fina e tratadas com ácidos clorídrico e sulfúrico e lavada (FA), jateado com granulação grossa e tratado com ácidos clorídrico e sulfúrico e lavada (CA) e jateadas com plasma de titânio (TPS). As células foram cultivadas em discos de plástico como controle e para determinar quando a confluência foi atingida. Os níveis de Prostaglandina E_2 (PGE_2) e fator de crescimento transformador β (TGF- β) no meio foram determinados usando-se radiomunoanálise. Foram encontradas uma relação inversa entre o número de células e rugosidade de superfície. O conteúdo total de PGE_2 no meio de cultura sobre as três superfícies rugosas (FA, CA e TPS) foi significativamente maior do que nas superfícies lisas e plásticas. A produção de TGF- β em superfícies rugosas (CA e TPS) foi em média três a quatro vezes maior do que em superfícies de plástico. Estes estudos indicam que a rugosidade de superfície afetou a produção de citocinas e fatores de crescimento pelas células MG63, sugerindo que essa rugosidade da superfície do Ti modula a atividade celular, interagindo com o implante e conseqüentemente proporcionando a cicatrização tecidual e o sucesso da osseointegração.

ONG *et al.* (1996) desenvolveram um trabalho relatando o efeito da topografia da superfície de titânio nas respostas celulares. Cultura de células osteoblásticas foram realizadas e discos de Ticp com rugosidade de superfície (R_a) variando de 0,11 a 0,28 μm . Os resultados mostraram que ocorreu adsorção de constituintes anorgânicos (cálcio e fósforo) sobre a superfície dos discos de Ticp imersos em α -MEM sem proteína. Os resultados também mostraram que ocorreu

adesão em ambas as superfícies. A cultura de células aderidas sobre a superfície menos rugosa mostrou um formato mais liso e arredondado, enquanto as localizadas sobre a superfície mais rugosa tinham um formato mais alongado. Os resultados mostraram que independentemente da rugosidade de superfície, ocorreu adesão celular e depósito de constituintes inorgânicos.

OZAWA & KASUGAI (1996) avaliaram três tipos de materiais de implantes (HA, cerâmica de vidro (GC) e cpTi passivados por ácido nítrico 28% durante uma hora), em relação à capacidade desses materiais permitirem a diferenciação de células osteoblásticas e a produção de tecido mineralizado em sua superfície. O estudo foi realizado pela mensuração do conteúdo de DNA, atividade da fosfatase alcalina (ALP) e cálcio (Ca), presentes na cultura. De células do estroma medular ósseo de fêmures de ratos adultos jovens. A expressão de osteopontina e sialoproteína óssea foi avaliada por meio de análise da expressão genética. As medidas de DNA não mostraram diferença entre os materiais, mas a ALP e o conteúdo de Ca na cultura de HA e GC foram maiores que nos grupos TícP e controle. A análise da expressão de genes revelou maior expressão de osteopontina e sialoproteína óssea na cultura de HA. A formação de nódulos mineralizados foi mais predominante na HA, seguida de GC. Esses resultados mostram que a HA e GC forneceram uma situação favorável para as células medulares se diferenciarem em osteoblastos, proporcionando maior quantidade de formação de tecido mineralizado sobre essas superfícies.

FRANÇOIS *et al.* (1997) avaliaram a atividade biológica da fibronectina sobre superfícies de Ti com o propósito de observar sua capacidade de. Foram preparados discos de TícP com três diferentes rugosidades: polidas ($1,081 \pm 0,47 \mu\text{m}$), processadas por polimento seguido por ataque ácido HCL e H_2SO_4 ($1,44 \pm 0,24$

μm) e preparadas por jateamento de areia e ataque ácido. Os resultados mostraram que a adsorção de fibronectina em substratos polidos foi menor que em substratos rugosos, mas não ocorreu diferença substancial nos dois grupos rugosos. Os autores concluíram que com o aumento da rugosidade do Ti não houve um aumento e sim uma redução dos níveis de adsorção de fibronectina “*in vitro*”.

PEBÉ *et al.* (1997) analisaram os valores de torque de remoção em implantes parafusados 3iTM preparados por polimento, jateamento por partículas de TiO_2 e por ataque ácido (clorídrico e sulfúrico). Esses diferentes tipos de implante foram comparados histomorfométricamente pela porcentagem de contato osso e implante são condições de carga e sem carga. Além disso, foi determinado o grau de correlação entre os valores de torque de remoção e o contato entre osso e implante com graus variáveis de rugosidade superficial. Os resultados desta investigação sugerem que a força na interface osso e implante seja determinada pelas características da superfície. As superfícies tratadas por ácido resistiram melhor ao torque de remoção que as outras superfícies. A avaliação histológica do contato ósseo com os vários tipos de superfícies de implantes não demonstraram uma vantagem definida para as superfícies mais rugosas em relação ao contato ósseo ao nível microscópico.

KLOKKEVOLD *et al.* (1997) compararam a resistência do torque para remoção de implantes de titânio com superfície tratada com duplo ataque ácido (HCl e H_2SO_4) e implante com superfície usinada. Os implantes foram fixados na região distal do fêmur de dez coelhos brancos adultos da Nova Zelândia. Após dois meses do período de cicatrização, os implantes foram removidos sob torque de rotação reversa com um dispositivo digital de medida de torque. A resistência do torque de remoção foi quatro vezes maior para os implantes com superfície tratada

por ácido quando comparados aos implantes usinados. Os resultados deste estudo sugeriram que o tratamento químico da superfície do implante de titânio aumenta significativamente a osseointegração, conforme determinação da resistência ao toque de rotação reversa.

LAMPIM *et al.* (1997), em um trabalho de revisão com o objetivo de relacionar parâmetros de avaliação sobre a biocompatibilidade de um biomaterial, relataram que a mensuração do grau de umectabilidade é um dos parâmetros de avaliação de biocompatibilidade de um material e que tal medida é expressa pelo ângulo de contato que um líquido (geralmente água) se forma sobre a superfície do material. Relataram que as moléculas envolvidas na adesão e proliferação celulares incluem moléculas da matriz extracelular (fibronectina e vitronectina), receptores transmembrana e componentes do citoesqueleto intracelular. Concluíram que a umectabilidade é um dos parâmetros para se avaliar a biocompatibilidade de um substrato e também que as características das superfícies dos implantes, assim como propriedades específicas de proteínas do meio intercelular, contribuem para a organização de proteínas adsorvidas e determinam a resposta celular aos implantes.

COOPER *et al.* (1998), nesta revisão, consideraram o uso apropriado de cultura celular para avaliar o efeito dos substratos no comportamento dos osteoblastos. De acordo com os autores, em culturas celulares a interação entre diferentes substratos pode ser medida em termos de citotoxicidade, adesão e proliferação celulares para a avaliação da interface osso e implante. A cultura celular permite também o acesso à informações moleculares que fomentam uma bioengenharia tecidual nanoestrutural. Desta maneira, a cultura celular oferece uma oportunidade única de se estudar o complexo fenômeno da osseointegração.

LINCKS *et al.* (1998), em uma pesquisa “in vitro”, avaliaram o efeito da

composição química e a rugosidade de superfícies do Ticp e do Ti-AL₆-V₄ em células MG-63. Discos de Ticp e do Ti-AL₆-V₄ foram ambos usinados e polidos de duas maneiras: finamente polidos com discos de papel e polidos com óxido de zircônio e óxido de alumínio, resultando em uma superfície lisa e polida (P) e em uma superfície rugosa (R). Cultura celular em superfície de plástico foi usada como controle. A topografia de superfície foi avaliada por MEV, enquanto a composição química foi determinada usando-se Espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier e por Espectrometria eletrônica Auger. O efeito da superfície foi avaliado 24 horas pós confluência pela medição da quantidade celular, atividade da fosfatase alcalina, incorporação de timidina no DNA, osteocalcina, produção de colágeno, incorporação de sulfato na proteoglicana, produção de PGE₂ e TGF-β. Quando comparado ao plástico, o número de células foi reduzido nas superfícies de Ticp, enquanto foi equivalente nas superfícies com Ti-AL₆-V₄. Os resultados mostraram que: o efeito estimulatório da rugosidade de superfície na atividade da fosfatase alcalina foi mais pronunciado nas superfícies rugosas, sendo que com atividade enzimática maior em superfícies Ticp-R; a produção de colágeno foi menor em superfícies Ticp, exceto em Ti-R e a incorporação de sulfato e de timidina foi reduzida em todas as superfícies. A rugosidade de superfície afetou a produção de TGF-β e PGE₂. O efeito estimulatório das superfícies rugosas na produção de TGF-β e PGE₂ foi maior nas superfícies Ticp do que em Ti-AL₆-V₄. Embora, segundo os autores, ainda não sejam conhecidas todas as propriedades dos biomateriais que possam induzir as respostas celulares, este estudo sugeriu que a rugosidade e a composição das superfícies de Ti desempenham um papel primordial na diferenciação celular e que o melhor desenho para um implante seja constituído por uma superfície de titânio pura e com micro rugosidades.

SMALL *et al.* (1998), nesta revisão literária apresentaram algumas idéias e observações sobre a geração do citoesqueleto de actina e estratégias alternativas que algumas células adotam para se espalhar e se mover sobre um substrato. O movimento de migração das células metazoárias resultam de mudanças coordenadas e polarizadas no formato celular, orquestrado pelo remodelamento contínuo do filamento de actina do citoesqueleto. A associação com os contatos focais estabilizam estes filamentos e é suposto que em substratos rugosos as células encontrem um número adequado de sítios de adesão, resultando em uma maior estabilidade.

BUSER *et al.* (1999) realizaram um estudo biomecânico em animais para analisar a interferência da resistência da interface óssea dos implantes à remoção por torque. Foram instalados implantes de Ticp usinados, somente tratados por ácido e jateados com areia de granulação 0,25-0,50 μ m, mais ataque de ácidos clorídrico e sulfúrico, lado a lado, em maxila de porcos. Após quatro, oito e doze semanas de cicatrização, o teste de torque de remoção foram realizado. Uma vez que os implantes com superfícies usinadas apresentaram menores valores de remoção ao torque quando comparados aos outros dois tratamentos de superfície, os autores concluíram que a resistência na interface dos implantes de Ti é significativamente influenciada pelas características de superfície.

CASTELLANI *et al.* (1999) estudaram o efeito da rugosidade de superfície no comportamento das células osteogênicas de medula de ratos. As células foram cultivadas sobre discos de Ticp com as seguintes superfícies: lisas (Ti M), ásperas por meio de papel de lixa 4000 (Ti 4000) e ásperas com papel de lixa 320 (Ti 320). A R_a ficou entre 0,3 e 0,8 μ m. Foram determinados os índices de adesão, proliferação, diferenciação e calcificação da matriz extracelular. A morfologia, adesão e

proliferação foram avaliadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Foram utilizados marcadores fluorescentes, Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), Difratometria de raios X (XRD) e Espectrometria de energia dispersiva (EDS) para obter informações quantitativas e qualitativas da composição da matriz extracelular (ECM). Os resultados demonstraram que em dois dias de incubação não existiam diferenças significativas na porcentagem de células aderidas aos substratos, mas aos cinco dias as superfícies Ti 320 mostraram porcentagem de aderência celular significativamente menores quando comparadas com as superfícies Ti M e Ti 4000. Aos oito dias, as superfícies Ti 320 mostraram aderência celular significativamente maior do que as outras superfícies. As superfícies Ti 4000 mostraram após oito dias, uma atividade de fosfatase alcalina significativamente maior quando comparadas às outras superfícies. Aos 15 dias de incubação, a atividade de ALP em substratos Ti 4000 foi significativamente menor do que em outros substratos. Não foram observadas diferenças significativas de ECM mineralizada entre as superfícies rugosas e polidas. Com base neste estudo “*in vitro*”, os autores concluíram que não se pode confirmar claramente o efeito da rugosidade de superfície em relação à proliferação, diferenciação e calcificação da matriz mineralizada.

COOPER *et al.* (1999) estudaram o papel da topografia da superfície de Ti no processo de formação da matriz extracelular e mineralização em culturas de osteoblastos fetais de mandíbula de bovino. Os autores observaram a habilidade dos osteoblastos na formação de matriz mineralizada. Foram utilizadas superfícies usinadas, pulverizadas com jato de Ti (TPS) e jateadas com partículas de TiO₂. Em superfícies TPS, as camadas superiores da cultura foram menos mineralizadas comparadas às camadas correspondentes em superfícies usinadas ou jateadas. A

expressão de sialoproteína bovina e osteopontina foi notadamente inferior nas culturas em TPS. Os autores concluíram que o processo de formação e mineralização da matriz pelos osteoblastos pode ser modificado pela topografia das superfícies dos implantes.

PULEO & NANJI (1999) relataram em uma de revisão literária com a finalidade de melhorar o entendimento da interface osso e implante, que estudos morfológicos têm revelado a heterogenicidade desta interface. Uma característica freqüentemente relacionada aos materiais de implante é uma zona interfacial afibrilar, comparável às linhas de cimento das interfaces ósseas naturais. Estas camadas interfaciais são ricas em proteínas não colagênicas, tais como osteopontina e sialoproteína óssea. Inúmeras pesquisas envolvendo alterações nas propriedades físico-químicas morfológicas e biomecânicas das propriedades de superfície têm sido investigadas com o objetivo de se obter uma interface osso e implante ideal. De interesse particular são os métodos bioquímicos de modificação de superfície, os quais imobilizam moléculas nos biomateriais com o propósito de induzir respostas celulares e teciduais específicas para controlar a interface tecido e implante com biomoléculas liberadas diretamente na interface.

ANSELME (2000a) descreveu sobre o desenvolvimento da engenharia tecidual e o fenômeno da adesão celular, em particular a importância das proteínas envolvidas na adesão dos osteoblastos aos biomateriais. Relatou que as proteínas da matriz extracelular são 90% colagênicas (colágeno e elastina) e 10% não colagênicas ou adesivas (osteocalcina, osteonectina, fibronectina, vitronectina, proteoglicanos, entre outras). Todas essas proteínas são sintetizadas pelos osteoblastos e a maioria está envolvida no fenômeno de adesão. "*In vitro*", a fibronectina e a vitronectina têm demonstrado envolvimento com adesão de

osteoblastos. Os sítios de adesão entre os tecidos da cultura celular e os substratos são chamados de contatos focais, que são junções onde a distância entre a superfície do substrato e da membrana celular é de 10 a 15 μ m. A face externa dos contatos focais apresenta proteínas receptoras específicas tais como as integrinas, que formam a principal família dos receptores de adesão celular. As integrinas que se encontram na superfície das células, são o principal recurso que elas dispõem para se relacionar entre si e com a matriz extracelular. Na face interna, algumas proteínas como a talina, paxilina, vinculina e tensina são conhecidas como mediadoras de interações entre os filamentos de actina do citoesqueleto e esses receptores de membrana (integrinas). A família das integrinas é composta de 22 heterodiméricos de dois tipos de subunidades (α e β), sendo 16 subunidades α e oito subunidades β . Essa diversidade de estrutura está associada com a variedade de possibilidades de ligantes, sendo que cada subunidade é constituída de um grande domínio extracelular, um domínio transmembrânico e um pequeno domínio citoplasmático. A integrina age como uma interface entre o compartimento intra e extracelular e se comporta como uma molécula sinalizadora induzindo à adesão, proliferação e migrações celulares, conseqüentemente regulando o crescimento e a diferenciação celular.

ANSELME *et al.* (2000b) aliaram quantitativamente a adesão de osteoblastos humanos sobre substratos metálicos (Ti-AL₆-V₄) com várias rugosidades de superfície em diferentes períodos após a inoculação, observando sua correlação com mudanças qualitativas na expressão de proteínas de adesão. As células se orientavam de maneira paralela nas superfícies polidas sendo que esta orientação não foi afetada pelos sulcos residuais após o polimento. Nas superfícies jateadas, as células nunca chegaram à confluência, tinham um formato estrelado e

não apresentavam organização. A orientação da matriz extracelular (fibronectina, colágeno tipo I e osteopontina) e proteínas do citoesqueleto (actina e vinculina) refletiam a orientação da camada de células. Os autores observaram uma menor adesão e proliferação nas superfícies mais rugosas e menos organizadas (jateadas).

McFARLAND *et al.* (2000) examinaram os mecanismos de adesão de células ósseas humanas (HBDC) em superfícies modificadas quimicamente com o objetivo de melhorar o entendimento de eventos envolvidos na geração de uma arquitetura tecidual definida na interface com os biomateriais. Fotolitografia foi utilizada para produzir tiras de papel com domínios alternantes de N-2-aminoetil-3-aminopropil-trimetoxilano (EDS) e dimetildiclorosilano (DMS) para cobrir discos de quartzo de 15 mm de diâmetro com a finalidade de produzir superfícies químicas e espacialmente separadas. Após 90 minutos de cultura, células HBDC foram localizadas preferencialmente nas regiões EDS do modelo. Utilizando-se soro especialmente esvaziado de glicoproteínas adesivas, observou-se que esta organização espacial era mediada pela adsorção de vitronectina (Vn) do soro dentro do domínio EDS. Em contraste, fibronectina (Fn) foi incapaz de adsorver nas superfícies por causa da competição de outros componentes do soro. Quando cobertas de solução pura, ou seja, na ausência de competição, cada proteína foi capaz de mediar a adesão celular. O espalhamento celular foi reduzido no domínio EDS, pela modificação da morfologia celular, falta de receptor de integrina e de formação de adesão focal. A localização de células HBDC na região EDS em substratos contendo EDS e DMS foi devido principalmente à adsorção de vitronectina do soro da cultura pelo domínio EDS. Isto foi atribuído à habilidade de adsorção da Vn, apesar da competição de outros componentes do soro. Em contraste a fibronectina foi incapaz de se adsorver nesta situação competitiva.

Ambas, Vn e Fn foram capazes de adsorção e promoção de adesão celular em ambas regiões (EDS e DMS), quando cobertas com soluções puras. Embora as células fossem capazes de aderir e iniciar um espalhamento nas regiões EDS, a formação de contato focal e a organização do citoesqueleto foram pobremente desenvolvidas, indicando que a restrição espacial afetou a organização celular. Os autores puderam concluir que os resultados sugerem que a influência inicial no formato celular pode ter um efeito na obtenção subsequente de uma função celular diferenciada.

WATAHA (2000) relatou conceitos sobre biocompatibilidade das ligas metálicas utilizadas em odontologia, com o propósito de expor aos Clínicos novas pesquisas e rever o que a literatura tinha escrito sobre os efeitos biológicos destas ligas. Entre as propriedades de um liga metálica, no que diz respeito à sua biossegurança, a mais relevante é a sua corrosão. De acordo com o autor, toxicidade local e sistêmica, alergia e carcinogenicidade são resultantes de elementos liberados pelos metais dentro da boca durante sua corrosão. Para minimizar riscos biológicos, os dentistas deveriam selecionar ligas que contivessem baixa liberação de elementos (baixa corrosão). Este objetivo pode ser conseguido pelo uso de ligas mais nobres, entretanto ocorrem exceções à esta generalidade e a seleção de uma liga deveria ser feita de acordo com cada caso, usando-se como critério de escolha a corrosão e dados biológicos fornecidos pelos fabricantes.

ARAÚJO *et al.* (2001) avaliaram a adesão e proliferação de osteoblastos em cultura celular derivada do tecido ósseo de osso parietal de ratos recém-nascidos (Osteo-1). Foram avaliados dois tipos de implantes comercialmente disponíveis, sendo que um deles era jateado com partículas grandes e o outro jateado com partículas grandes mais condicionamento ácido (SLA). Três amostras

de cada tipo de implante foram imersas em suspensão celular e três dias após o plaqueamento, as amostras foram analisadas em MEV. Não se observaram diferenças significativas entre os dois sistemas de implantes quanto à morfologia, adesão e proliferação celulares, contudo, as células do grupo que sofreu apenas jateamento com partículas grandes apresentaram crescimento desde o primeiro até o último dia do experimento, atingindo confluência total em três dias, enquanto que no grupo SLA as células alcançaram um platô de crescimento dois dias após o plaqueamento, sem atingir confluência total. Os autores concluíram que a maior rugosidade das superfícies que sofreram jateamento com partículas grandes contribuiu para a proliferação celular mais rápida.

DELIGIANNI *et al.* (2001) realizaram um trabalho para avaliação do efeito da rugosidade da superfície de Ti – Al₆ – V₄ na adsorção de proteínas e na adesão celular “*in vitro*”. Foi realizada cultura de células de medula óssea humana sobre discos de Ti com três tipos de rugosidade ($R_a = 0,320; 0,490$ E $0,874\mu\text{m}$). Os resultados mostraram que a adesão e proliferação celulares foram maiores como aumento da R_a . Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão da quantidade de ALP. Mais fibronectina foi adsorvida sobre superfícies rugosas. Os resultados sugeriram que a rugosidade de superfície aumenta a adesão e proliferação celulares, bem como a adsorção de proteínas da matriz extracelular sobre os substratos.

LIM *et al.* (2001) realizaram um estudo utilizando células de osteossarcoma humano (MG-63), cultivadas em discos de Ti com diferentes tratamentos de superfície para elucidar a relação entre a rugosidade de superfície e o ângulo de contato de várias superfícies de Ti. As superfícies utilizadas no estudo foram: Ticp, Ti- Al₆- V₄ e liga de titânio e níquel (TiNi). O ângulo de contato foi

medido usando-se água destilada, solução de cloreto de sódio a 1%, neutrófilos humanos e células osteoblásticas. A cristalografia de superfície foi identificada por Difractometria eletrônica de transmissão. Os resultados encontrados foram: a) não houve diferença significativa no ângulo de contato entre os quatro meios; b) para Ticp, o tratamento combinado (ácido hidróflúrico, ácido nítrico e água) demonstrou o menor ângulo de contato em água, enquanto a superfície tratada com ácido sulfúrico demonstrou o maior valor; c) para todas as amostras de Ticp, quando o ângulo de contato era maior que 45 graus, ele crescia linearmente com a R_a (natureza hidrofóbica) e a superfície era recoberta com óxido de rutilo somente, enquanto o ângulo de contato decrescia linearmente com a R_a quando era menos que 45 graus (natureza hidrofílica) e a superfície era recoberta com uma mistura de óxido de rutilo e anatase; d) resultados similares foram encontrados para Ti- Al₆- V₄ TiNi. Os autores concluíram que as amostras que se revelaram hidrofílicas não estavam somente relacionadas ao tipo de tratamento dado ao Ti, mas também à estrutura do filme de óxido formado sobre o titânio.

KUMARI *et al.* (2002) observaram células fibroblásticas de mamíferos e células MG-63 e suas interações com diferentes biomateriais com a finalidade de auxiliar no desenvolvimento de novos materiais biocompatíveis. Células fibroblásticas foram cultivadas nas seguintes superfícies: titânio, hidroxiapatita, vidro e polímero e posteriormente foram avaliadas ao MEV e ao microscópio fluorescente. As células cultivadas em superfície controle (vidro) demonstraram uma morfologia normal durante as fases iniciais de adesão. Em polímeros, as células mostraram-se menos aderidas quando comparadas à outros substratos. Um número maior de células aderiram em superfícies de titânio e hidroxiapatita após 30 minutos. Após 90 minutos de contato, as células se espalharam nas superfícies e desenvolveram

filopodia. As células que não se espalharam envolveram em microapêndices e pontes. De acordo com os autores, o espalhamento celular é uma função essencial da célula que está aderida sobre uma superfície e precede a função de proliferação celular para finalmente cobrir a superfície do substrato. A diminuição da adesão celular é usada como uma medida de toxicidade em trabalhos que investigam a adesão inicial de células. Biocompatibilidade e biossegurança são fatores a serem considerados na aplicação clínica de um biomaterial, que não pode causar nenhum tipo de reação adversa para a vida do paciente. O uso de métodos “in vitro” para avaliar a biocompatibilidade do material pode reduzir a extensão de testes em animais e reduzir significativamente os custos dos testes. Células MG-63 foram cultivadas nos mesmos substratos e coradas para actina e vinculina. As amostras foram observadas em Microscópio Óptico Fluorescente para análise da adesão e espalhamento celulares. A fase de adesão envolve várias moléculas como as proteínas da matriz extracelular, proteínas da membrana celular e proteínas do citoesqueleto de actina, as quais se interagem para a indução de sinais transdutores, promovem a ação de fatores de transcrição e conseqüentemente regulam a expressão genética. O espalhamento celular e a adesão são fenômenos que envolvem uma complexa reorganização do citoesqueleto. Uma malha difusa de filamentos de actina foi mais observada no Ti e poucos filamentos transcelulares foram observados na HÁ. A utilização de um anticorpo específico para vinculina permitiu a observação desta proteína. A visualização da vinculina nas células cultivadas mostraram uma distribuição citoplasmática, com indicações circunferenciais na borda das células. As células cultivadas no vidro, demonstraram mudanças no tamanho celular e injúrias no núcleo, na Ha as células se espalharam e no Ti as células se espalharam, tomaram um aspecto poligonal com extensões

citoplasmáticas difusas. No presente estudo, a natureza do contato inicial, a adesão celular e o espalhamento foram avaliadas por MEV e Microscopia Óptica Fluorescente. Os autores concluíram que a interação entre a superfície dos substratos e as células é um fenômeno complexo e que um melhor entendimento destas interações se faz necessário para a melhoria das características dos biomateriais e para o desenvolvimento de novas superfícies ou modificações das já existentes.

TER BRUGGE & JANSEN (2002) testaram as interações iniciais de células de medula óssea de ratos (RBM) cultivadas em discos de Ti com superfícies usinadas, jateadas com AL_2O_3 e recobertas com fosfato de cálcio (CaP). Os discos foram imersos na suspensão de células e foram analisados a adesão, expressão de integrina, o espalhamento e a morfologia celulares. Os autores não encontraram diferença na adesão da RBM aos materiais. Encontraram a diferença em porcentagem de células aderidas dentro de períodos entre os tempos de replicação. As células RBM em todos os materiais expressaram as subunidades de integrina $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ e $\beta 1$. Para $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ e $\beta 1$, não se encontrou diferenças entre suas expressões em células aderidas e não aderidas. A expressão de $\alpha 3$ também foi similar em células aderidas e não aderidas durante a fase inicial de cultura. Ao final da cultura, a expressão de $\alpha 3$ foi menos regulada por células aderidas do que por não aderidas, Isso resultou em uma expressão maior de $\alpha 3$ para células não aderidas quando comparadas às células aderidas. As células se espalharam em todos os materiais e alcançaram um tamanho maior em superfícies usinadas do que em rugosas. Quanto à morfologia, houve uma diferença entre as superfícies pois; em superfícies usinadas as células apresentaram um corpo mais compacto com prolongamentos celulares mais curtos. Em superfícies rugosas as células mostraram

uma morfologia mais alongada, com prolongamentos celulares mais finos. Com esses achados, os autores concluíram que as características das superfícies dos substratos dos materiais usados no experimento não influenciaram na adesão ou na expressão da integrina durante as interações iniciais da célula e material, porém, o comportamento de espalhamento e a morfologia celular dependem das características de superfície dos substratos.

TER BRUGGE *et al.* (2002), demonstrou em um estudo para a investigação do efeito da superfície do substrato na interação inicial de uma linhagem celular derivada de osteossarcoma (U2OS), diferenças na adesão, espalhamento e expressão de integrinas entre as superfícies. Observaram que a adesão inicial de U2OS foi inferior em superfícies lisas em relação às superfícies rugosas. As células nas superfícies lisas apresentaram uma membrana celular com muitas protrusões em todas as direções durante a adesão e o espalhamento, enquanto que as células na superfície rugosa mostraram uma membrana celular lisa. Segundo os autores, o espalhamento celular e o formato das células são moduladores importantes das funções celulares. A restrição do espalhamento em osteoblastos humanos está associada com a falta de receptores de integrina e de formação de contatos focais. Em muitos tipos de células, as mudanças na função celular são acompanhadas pelas mudanças no formato celular. Nessas células, a inibição do espalhamento célula resultou na indução da apoptose, sendo que a proliferação somente acontece em células que são espalhadas e as propriedades das substâncias adsorvidas em um material podem afetar diretamente o espalhamento celular. Devido à estrutura tridimensional da superfície rugosa, as superfícies lisas podem se espalhar em uma área maior do que células em superfícies rugosas. Ao se acomodarem em uma superfície rugosa, as células

conseguem uma superfície de contato maior, sem necessidade de promover um espalhamento lateral extenso. Além do tamanho celular, a expressão de integrina é também afetada pelas características da superfície. A avaliação da cultura das células U2OS nesse trabalho demonstrou que as subunidades de integrinas expressas pelas células incluíram $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv e $\beta 1$. A subunidade α tem sido demonstrada como determinante na especificidade do ligante da integrina, entretanto, o domínio citoplasmático da subunidade β interage com sinalizadores e proteínas do citoesqueleto. O espalhamento celular parece ser dependente da atividade da subunidade $\beta 1$. Neste experimento, os autores somente encontraram diferenças na expressão de $\beta 1$ entre substratos de Ti e substratos cobertos com fosfato de cálcio. Como os resultados obtidos informaram somente a respeito da quantidade $\beta 1$ e não sobre sua distribuição espacial, foi difícil relacionar a expressão de $\beta 1$ às mudanças na adesão e espalhamento dos osteoblastos. Foi observado um aumento na expressão de $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ e αv nas superfícies recobertas com fosfato de cálcio, ao contrário das superfícies de titânio.

CASSINELLI *et al.* (2003) realizaram um estudo para determinar “*in vitro*” citotoxicidade e adesão celular em três superfícies de implante. Todas as amostras eram usinadas, porém submetidas a diferentes procedimentos de limpeza. Uma das amostras era saída diretamente do torno (nc), as outras duas foram submetidas a uma rotina de limpeza parcial (pc) e total (tc). A citotoxicidade foi avaliada utilizando-se cultura de fibroblastos de ratos e a adesão foi avaliada em cultura de células derivadas de osteossarcoma humano (SaOS-2). As superfícies usinadas sem protocolo de limpeza, mostraram uma superfície contaminada por óleos lubrificantes. Em implantes pc e tc, um aumento de Ti e uma diminuição na proporção de carbono e titânio foi proporcional ao aumento no índice de limpeza. Os resultados

demonstraram que não foi detectada a presença de células nas superfícies nc, entretanto, as células aderiram, espalharam e cresceram nas superfícies pc e tc e as fotografias mostraram claramente que o número de células por unidade de área foi maior nas superfícies pc. Os resultados do presente estudo demonstraram que uma observação apurada da superfície química das amostras de implantes usadas em estudos “in vitro” deve ser parte integral de cada estudo sobre a resposta biológica à rugosidade de superfície de implantes de titânio.

DAVIES (2003) fez uma revisão das características da macro e da microtopografia dos implantes e das respostas do hospedeiro tendo em vista que o sucesso clínico da terapia com implantes bucais é baseada na ancoragem dos componentes endósseos do implante no tecido ósseo . De acordo com o autor, a microtopografia da superfície do implante é crítica não somente para a geração da osteogênese de contato, mas também para o fato de que a elaborada matriz óssea poderá ou não se unir à esta superfície. O autor afirma que embora existam muitos aspectos da cicatrização periimplantar que necessitam serem elucidados, tenha os resultados do tratamento com implantes endósseos depende do desenho da superfície do implante, o qual otimiza as respostas biológicas nos eventos precoces que envolvem a cicatrização, como a adesão e proliferação celulares sobre as superfícies de titânio.

ROSA & BELOTI (2003a) avaliaram em um estudo sobre os efeitos da composição química do Ti e da rugosidade de superfície sobre o comportamento de células medulares osteogênicas de ratos, adesão e proliferações celulares, o conteúdo de proteína total, a atividade da fosfatase alcalina (ALP) e a formação de nódulos mineralizados. As células foram cultivadas sobre discos de cpTi e liga de TiAL₆V₄ com quatro diferentes rugosidades. Para a avaliação da adesão celular, as

células foram cultivadas por duas horas, para a mensuração da proliferação celular, conteúdo de proteína total e atividade de ALP, por 14 dias e 21 dias de cultura para observação dos nódulos de mineralização. A adesão celular e a quantidade de proteína total não foram influenciadas pela composição química ou rugosidade de superfície. A proliferação, atividade de ALP e a formação de nódulos de mineralização foram influenciadas somente pela composição química. Os resultados sugeriram que o T1cp otimizaria a diferenciação osteoblástica *“in vitro”*, sendo que os diferentes valores de R_2 não alteram significativamente a resposta celular.

ROSA & BELOTI (2003b), em um estudo *“in vitro”*, com o objetivo de avaliar os efeitos da rugosidade do T1cp sobre a adesão, proliferação e diferenciação celulares. Foram preparados discos de Ti com diferentes R_a . A adesão celular não foi afetada pela rugosidade de superfície. A proliferação, quantidade de proteína total e atividade de ALP foram influenciadas, enquanto que não se observou um aumento estatisticamente significativo na formação de nódulos de mineralização em superfícies com R_a próximo a $0,80 \mu\text{m}$. Os resultados obtidos sugerem que um R_a entre $0,80$ e $1,90 \mu\text{m}$ otimizaria os eventos celulares intermediários e finais, mas não influenciariam os eventos iniciais, e que superfícies lisas não favoreceriam as respostas celulares.

OGAWA & NISHIMURA (2003) analisaram a morfologia e a integração osso e implante bem como a expressão genética da matriz extracelular para avaliar a resposta biológica em relação à diferentes topografias de superfície. Foram utilizados neste estudo implantes usinados e implantes submetidos a duplo ataque ácido (DE), ambos com câmaras de fixação apical. A curva de integração óssea (BIC) foi criada por meio de mensurações histomorfométricas em série, nas câmaras dos implantes. A expressão do mRNA dos genes de componentes da matriz

extracelular durante a cicatrização óssea com ou sem implantes, foram examinados utilizando a técnica de PCR (reação de polimerase em cadeia). Os resultados indicaram que os implantes DE comparados aos usinados, tiveram uma expressão acelerada de mRNA para osteocalcina, bem como uma expressão aumentada de sialoproteína II, colágeno III e integrinas nos estágios iniciais de cicatrização. Pela análise dos resultados, foi concluído que os implantes com duplo ataque ácido favorecem a expressão de proteínas da matriz extracelular.

POSTIGLIONE *et al.* (2003) avaliaram a resposta biológica de células SaOS, cultivadas em superfícies de titânio submetidas a diferentes tratamentos. As superfícies analisadas foram: usinadas (S), com jateamento abrasivo (SB) e jateadas com plasma de titânio (TPS). Após o cultivo celular, as células foram submetidas a análise por Citometria de fluxo. A proliferação celular foi significativamente superior nas superfícies usinadas (S) e a síntese de proteínas da matriz extracelular foi superior nas superfícies TPS e SB comparadas às usinadas (S). As análises de receptores de integrina mostraram maior expressão em TPS comparada a superfícies B e SB. Ocorreu um aumento na atividade de ALP somente nas superfícies TPS e SB. A análise de apoptose celular não demonstrou diferença entre os três tipos de superfícies, portanto, os resultados demonstram que embora ocorra uma maior proliferação de células SaOS-2 em superfícies usinadas, as superfícies rugosas promovem sua diferenciação em fenótipos osteoblásticos. Os autores concluíram por meio da análise dos dados deste experimento, que superfícies rugosas favorecem o comportamento osteoblástico, por induzirem à diferenciação celular e que provavelmente favoreçam o fenômeno de osseointegração, relataram ainda que futuros estudos seriam necessários para suportar esta hipótese.

GUIZZARDI *et al.* (2004) avaliaram a resposta de osteoblastos humanos,

obtidos de amostras removidas durante procedimento cirúrgico de um paciente jovem (cinco anos), em superfícies de Ti submetidas a diferentes tratamentos. Foram preparados discos de cpTi com seis tratamentos de superfície: simplesmente usinada SS, TPS e quatro superfícies jateadas com partículas abrasivas diferentes: Al_2O_3 100 μm (C100); Al_2O_3 150 μm (C150); ZrO_2 (óxido de zircônio) 60 μm (B60) e ZrO_2 120 μm (B120). Todas as superfícies jateadas foram também submetidas ao ataque ácido (SLA). Observações em MEV revelaram diferenças na microtopografia, com uma densidade celular maior em superfícies SLA do que em SS e TPS e mais regularidade no alinhamento celular nas superfícies B60 e B120. A curva de crescimento demonstrou uma adesão maior nas superfícies SLA comparadas às SS e TPS. O número de células aumentou em todas as superfícies SLA, especialmente nas amostras B60. As análises revelaram vestígios (debris) de Al_2O_3 nas amostras C100 e C150, parcialmente explicando os poucos resultados encontrados nestas superfícies. Considerando essa substância como tóxica para os osteoblastos da cultura. Os autores consideraram as superfícies SLA (B60 e B120) mais biocompatível do que as superfícies SS e TPS.

ELIAS *et al.* (2005) realizaram um estudo onde analisaram as morfologias das superfícies de implantes dentários com superfície usinada e tratados com ácido, jateamento, feixe de laser e oxidação com o propósito de avaliar a morfologia destas superfícies. Os autores relataram que durante a cicatrização que ocorre em alguns dias e a remodelação que necessita de semanas ou até anos, ocorrem mudanças biológicas na interface implante e hospedeiro, que dependem das propriedades da camada inicial de óxido de titânio. Para acelerar os micro mecanismos de ligação do implante aos tecidos, os implantes são submetidos aos tratamentos de superfície. Os autores submeteram os implantes a diferentes tratamentos e os analisaram por

MEV. os resultados obtidos mostraram que as superfícies de implantes usinadas ou tratadas com laser apresentaram morfologia anisotrópica e os implantes tratados com ácidos, jateados ou oxidados possuíam a superfície mais homogênea e com características morfológicas isotrópicas. Com esses resultados, os autores concluíram que a vantagem da superfície isotrópica está associada à melhor bioadesão das células, crescimento celular em todas as direções da superfície e menor tempo de osseointegração.

KU *et al.* (2005) avaliaram a ação de uma superfície de Ti construída biomimeticamente pela cobertura de fragmentos recombinantes de fibronectina e vitronectina, que contém os sítios de ligação de integrinas, sobre o comportamento celular. De acordo com os autores, a fibronectina (FN) e a vitronectina (VN) são as maiores proteínas celulares adesivas encontradas na matriz extracelular de vários tecidos e do sangue circulante. Os discos de Ti preparados com moléculas recombinantes foram cultivados em cultura de células imaturas derivadas de calvária de ratos (MC3T3-E1), observando-se a adesão celular, a proliferação, a atividade da fosfatase alcalina e a formação óssea. Células MC3T3-E1 em Ti recoberto com fragmento recombinante de fibronectina (FN₈₋₁₀) demonstraram um aumento da adesão, proliferação e diferenciações celulares, quando comparado aos fragmentos recombinantes de vitronectina (VN_{ntd}). Os autores concluíram que esses resultados sugerem que a superfície de Ti modificada por FN₈₋₁₀ pode melhorar o resultado da osseointegração.

KROESE *et al.* (2005) investigaram a formação óssea em malhas de Ti poroso, cobertas com uma seqüência de peptídeo de arginina - glicina - ácido aspártico (RGD) comparada a uma malha de Ti não recoberta para observarem se as superfícies modificadas por peptídeos influenciam as repostas celulares “*in vitro*”.

As integrinas, as quais se ligam às específicas seqüências peptídicas curtas, são responsáveis por estas respostas celulares, uma vez que algumas proteínas da matriz como a fibronectina contém esta seqüência de peptídeos que se ligam às integrinas. Desta maneira, as informações podem ser transmitidas para o núcleo por meio de alguns sinais citoplasmáticos. O Ti coberto com RGD foi inserido no crânio de ratos, comparado a uma fibra de Ti não recoberta e num defeito aberto como controle. Exames histológicos e histomorfométricos foram realizados e um aumento significativo na formação óssea foi observado no grupo Ti-RGD comparado com o grupo com Ti somente. Todos os defeitos permaneceram abertos nos três períodos (duas quatro e oito semanas). Os autores concluíram que a utilização do peptídeo RGD em combinação com malhas de Ti demonstrou um efeito positivo na formação óssea “*in vivo*” em modelo animal.

LINDHE (2005) relatou as principais características das superfícies, sendo que focou o seu relato na topografia de superfície, definida pelo tipo de tratamento recebido. O autor denominou de superfícies isotrópicas aquelas produzidas por técnicas de jateamento abrasivo, TPS, ataque químico ou oxidação. Denominou de superfícies anisotrópicas aquelas cujos processos como o torneamento e fresagem resultam em superfícies com um padrão de irregularidade.

NAYAB *et al.* (2005) observaram os efeitos da implantação do íon cálcio nas células ósseas humanas com o objetivo de analisar a sua interação com o titânio. Foram preparados discos de Ti com níveis baixos, médios e altos de Ca e cultivados em células MG63. Foram analisadas a expressão da subunidade $\alpha 5\beta 1$ da integrina e a formação de placas focais de adesão. Os resultados mostraram que a adesão em discos de Ti com alto nível de Ca foi inicialmente reduzida, mas posteriormente foi não somente restaurada, como substancialmente aumentada.

Não se observaram diferenças relevantes no comportamento celular em discos de Ti com Ca médio e baixo. Os achados dos autores sugeriram que a implantação de Ca pode afetar a adesão de células MG-63, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, entretanto, esse efeito parece depender do nível do Ca implantado.

ROUABI *et al.* (2006) estudaram sob um parâmetro cinético, a adesão de células SaOS-2 por 30 minutos durante quatro dias para investigarem sua interação em HA microporosa (mHA) e não microporosa (pHA) em comparação com Ti polido. Os autores associaram a visualização de proteínas adesivas dentro das células por imunohistoquímica e a expressão quantitativa dos genes em nível de mRNA pelo método de reação de polimerase em cadeia (PCR). A adesão celular foi superior na mHA de 30 minutos a 24 horas, embora o crescimento celular observado na mHA tenha sido o menor após quatro dias. A revelação de anticorpos de proteínas do citoesqueleto (actina) e adesões focais (FAK) confirmaram que a adesão e o espalhamento foram diferentes nos três materiais. As fibras de actina foram menos numerosas e mais curtas na mHA, sendo que as células tiveram mais contato focal após quatro horas na mHA comparado aos outros substratos, porém, após 24 horas observou-se um decréscimo. Os valores mais elevados de proteínas totais foram extraídos da mHA de 0,5 em 24 horas e da pHA de 1, 4 em 96 horas. A expressão da ALP após quatro dias foi menor na mHA comparado aos outros materiais, demonstrando que a microestrutura da cerâmica de mHA não foi favorável na diferenciação celular de SaOS-2. Os autores concluíram nesse estudo que HA e Ti influenciam tanto a expressão genética nos estágios iniciais de adesão, bem como a proliferação e diferenciação celulares.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo é avaliar o comportamento “in vitro” de células osteoblásticas em superfície de titânio usinada por meio de MEV, especificamente:

- a) o implante de titânio, comercialmente disponível¹, a ser estudado apresenta uma superfície biocompatível?
- b) a superfície de titânio usinada do implante utilizado neste experimento permite a adesão e proliferação “in vitro” de uma linhagem celular osteoblástica?
- c) qual é a maneira das células colonizadas se espalharem na superfície do implante de titânio?

¹ Implante Titamax Liso-Neodent

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Substrato

Foi utilizado para o experimento: IMPLANTE TITAMAX LISO®-NEODENT, com um diâmetro de 3,75 mm e comprimento de 13mm.

4.1.1 Descrição do produto

Os implantes Titamax liso possuem um desenho cilíndrico com roscas piramidais e passos variando como diâmetro do implante (macro superfície). Apresenta uma superfície lisa, resultante de usinagem em torno CNC automático (Traub TNL 12, Alemanha).

4.1.2 Composição

A matéria prima utilizada na fabricação do implante Titamax liso é o Titânio Grau II (ASTMF67).

4.2 Cultivo Celular

Foi utilizada uma linhagem celular originada de tecido ósseo parietal de ratos recém-nascido, denominada Osteo-1.

As células foram mantidas em nitrogênio líquido, em tubos de congelamento, protegidas por di-metil-sulfóxido (DMSO - Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA) e foram descongeladas em banho Maria a 37°C por dois minutos.

As células em suspensão foram transferidas para placas de cultura de 75 cm², contendo 15ml de meio de cultivo fresco (DMEM - meio de Eagle modificado por Dulbecco - Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA), pH 7,4 contendo 1% de solução antibiótica/antimicótica e 10% de soro fetal bovino (Cultilab Ltda., Campinas, Brasil) e foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. O desenvolvimento da cultura de células foi avaliado em microscópio de fase invertida e o meio de cultura foi trocado a cada dois ou três dias, de acordo com o metabolismo celular.

Ao final de duas semanas, as células tinham colonizado toda a superfície, o meio de cultura foi removido, as placas lavadas em PBS (solução salina tamponada), pH 7,4 e as células aderidas foram liberadas enzimaticamente por 1 ml de solução de tripsina 0,25% (Sigma) e EDTA 1mM (ácido etilenodiaminotetracético). A enzima foi inativada com meio de cultura e as células em suspensão foram centrifugadas a 3000 rpm durante cinco minutos.

Após a aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi dissolvido em meio de cultura fresco e alíquotas foram distribuídas em novas placas. Cada procedimento de cultura deu origem a uma nova passagem e durante todo o experimento amostras representativas foram novamente congeladas em nitrogênio líquido.

4.3 Preparo e análise das amostras

Após o cultivo das células, foi preparada uma suspensão celular de 10⁶ células por meio DMEM e esta suspensão foi plaqueada sobre três amostras do implante, os quais foram mantidos fixos por meio de um dispositivo similar a um

clipe, confeccionado com fio ortodôntico nº9 (FIG. 1). Os dispositivos foram previamente esterilizados em autoclave e presos aos implantes. Os recipientes foram incubados a 37°C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. e todos os experimentos foram efetuados em triplicata.

Após 24, 48 e 72 horas do plaqueamento, as amostras foram desidratadas em etanol 100% e submetidas à secagem química com hexamethildisilazane (HMDS). Efetuada a lavagem, as amostras foram colocadas em câmaras de vácuo com pressão de 5×10^{-2} Pa, para recobrimento com camada de ouro (20nm). Esta camada de ouro é obtida pelo bombardeamento de íons de Argônio no eletrodo de ouro, denominada técnica de Sputtering (FIG. 2).

Após o preparo das amostras, elas foram dispostas dentro do MEV, marca LEO 430 (FIG. 3 e 4) para se processar a varredura e obtenção das fotomicrografias (FIG. 5) com um aumento de 50 a 400x, as quais foram posteriormente analisadas para se obter os resultados do experimento.



FIGURA 1 - Implantes fixos por fio ortodôntico nº 9.



FIGURA 2 - Amostras recobertas com camada de ouro (20nm) pela técnica de Sputtering..



FIGURA 3 - Microscópio Eletrônico de Varredura – LEO 430.

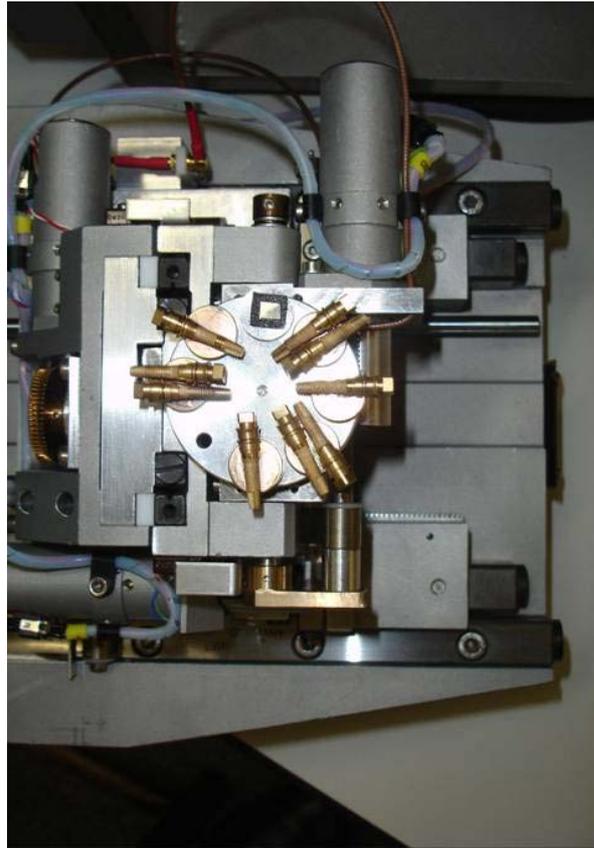


FIGURA 4 - Amostras dispostas no MEV.



FIGURA 5 - Processo Varredura para a obtenção de fotomicrografias.

5. RESULTADOS

Por meio de análise em MEV, observamos uma topografia de superfície de Ti lisa, limpa, sem presença de partículas estranhas e com ranhuras oriundas do processo de usinagem (FIG. 6 e7).

Pela análise dos resultados da cultura celular, a superfície usinada do implante analisado demonstrou que ocorreram adesão e proliferação celulares durante o período de observação de 24 a 72 horas.

Após 24 horas de plaqueamento observamos, em uma imagem panorâmica (FIG. 8), células aderidas sobre parte da superfície usinada do implante. Em um aumento (FIG. 9 e 10) verificamos que estas células demonstram uma orientação anisotópica com afinidade pelas ranhuras do processo de usinagem do implante.

Após 48 horas, analisando uma fotomicrografia com um aumento de 400x (FIG. 11), podemos observar que as células apresentam uma característica morfológica mais definida, com um corpo compacto e plano (achatado) e com prolongamentos citoplasmáticos curtos.

A análise após 72 horas (FIG. 12), demonstra uma resposta favorável no comportamento celular pela proliferação celular sobre a superfície do titânio usinada comparando-se à imagem observada em 48 horas com uma mesma magnificência (400x). A fotomicrografia nos mostra células espalhadas e proliferadas, com uma morfologia grande e plana e com prolongamentos citoplasmáticos acompanhando as marcas ou ranhuras de usinagem do implante. Em uma imagem panorâmica observamos que ocorreu espalhamento e proliferação sobre a superfície usinada

(FIG. 13).

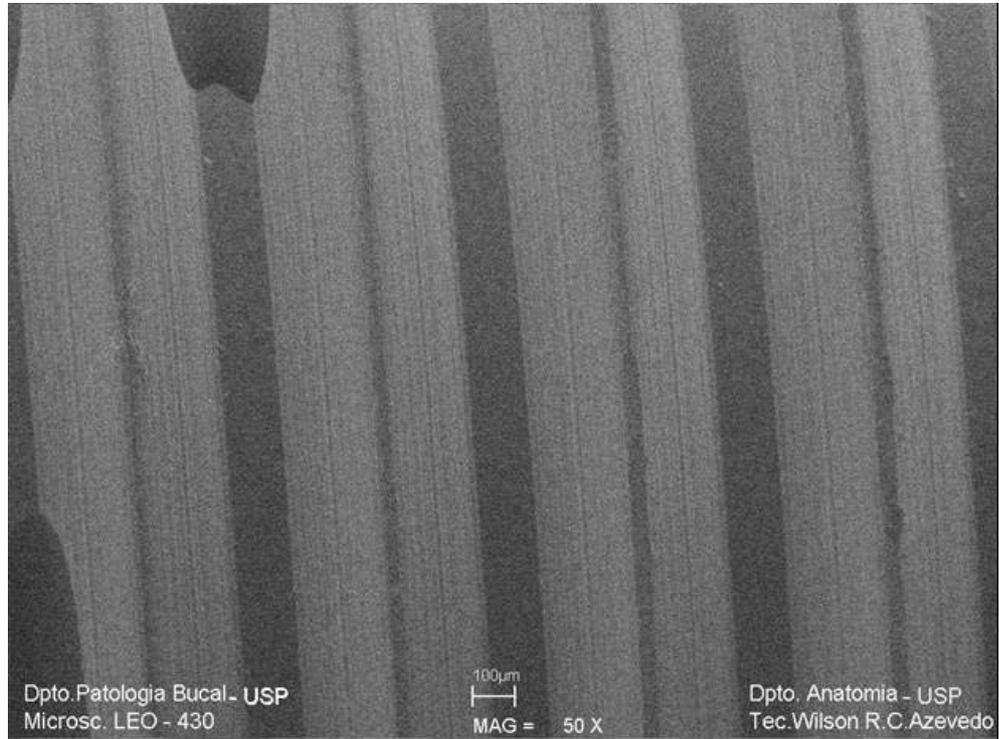


FIGURA 6 - Topografia da superfície de Ti avaliada em menor aumento (50x).

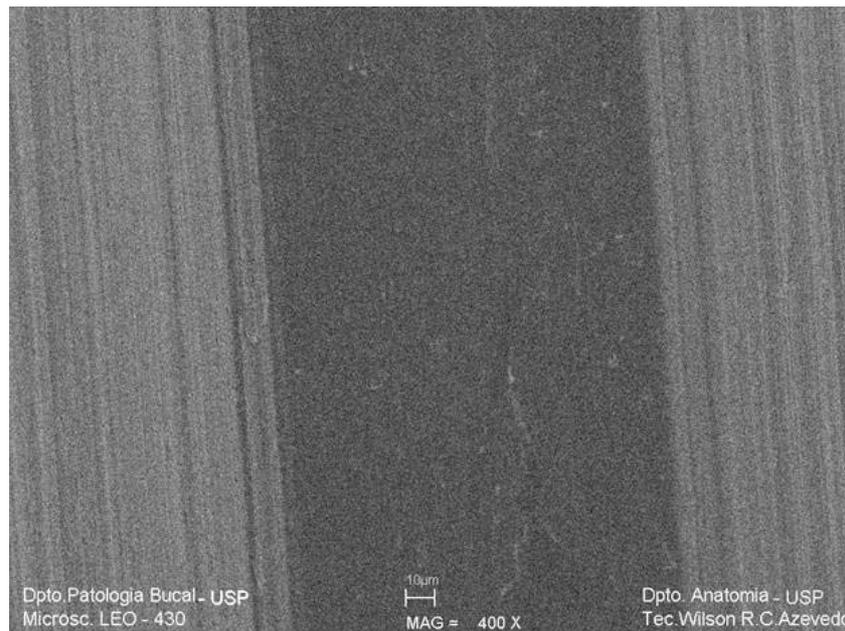


FIGURA 7 - Topografia da superfície de Ti avaliada em maior aumento (400x).

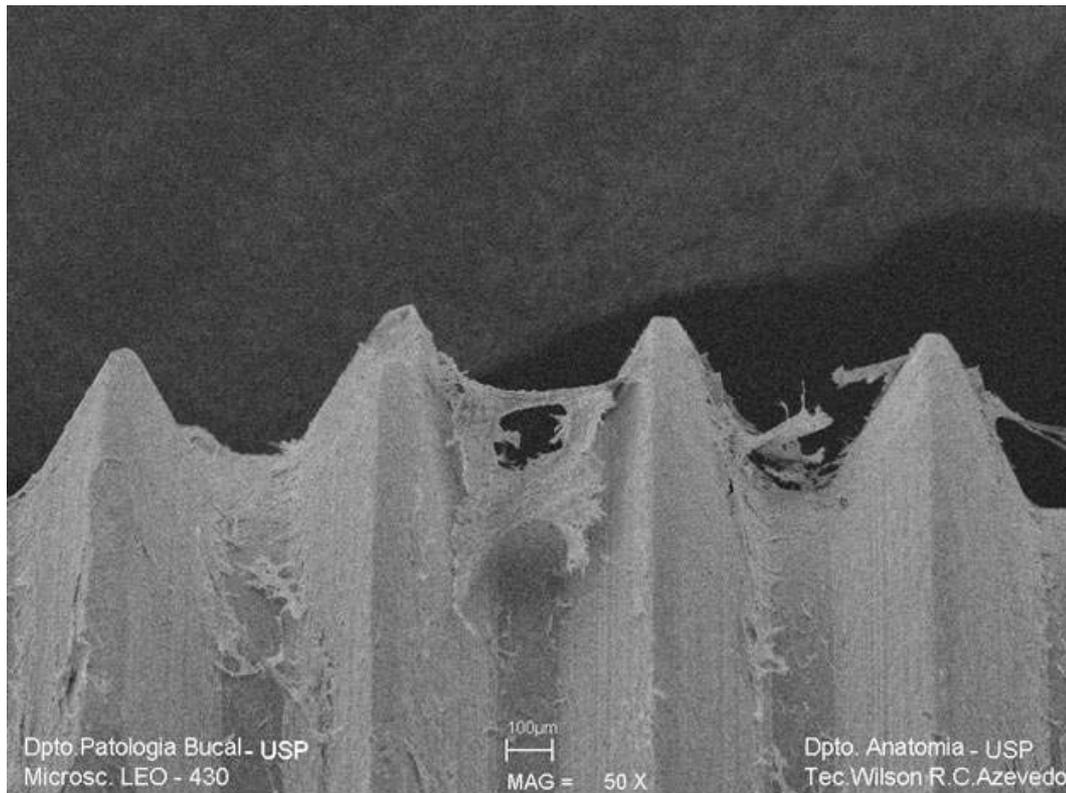


FIGURA 8 – MEV - 24 hs com- imagem panorâmica do implante de Ti usinado 24hs (50x).

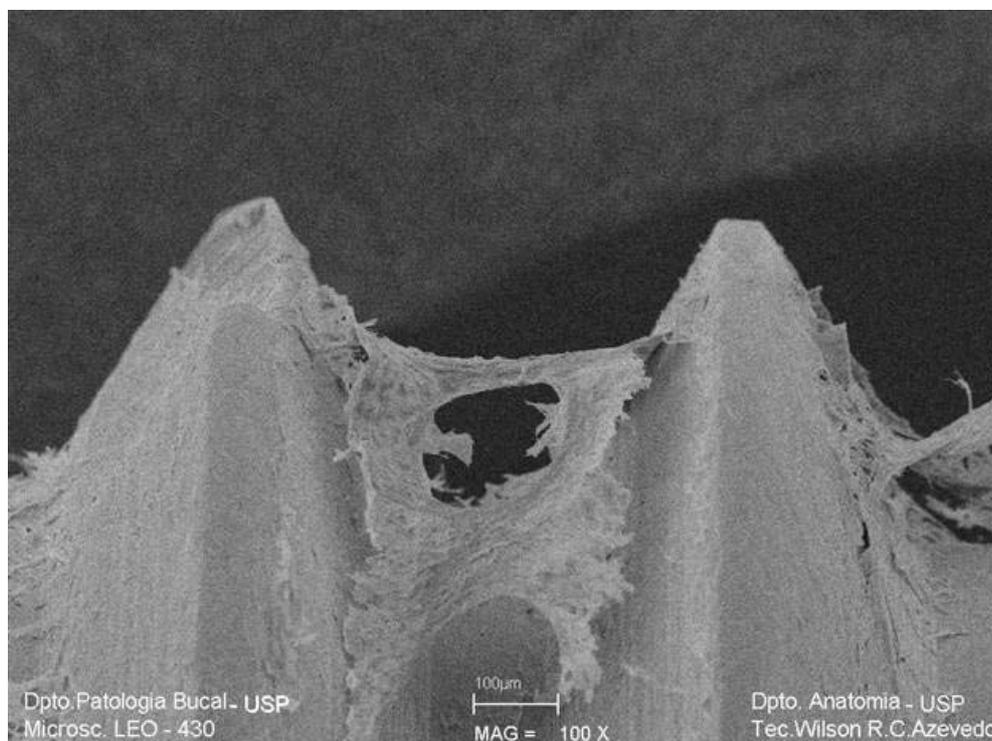


FIGURA 9 - MEV- 24 hs com células Osteo-1 aderidas à superfície de Ti usinada, demonstrando uma orientação anisotrópica (100x).

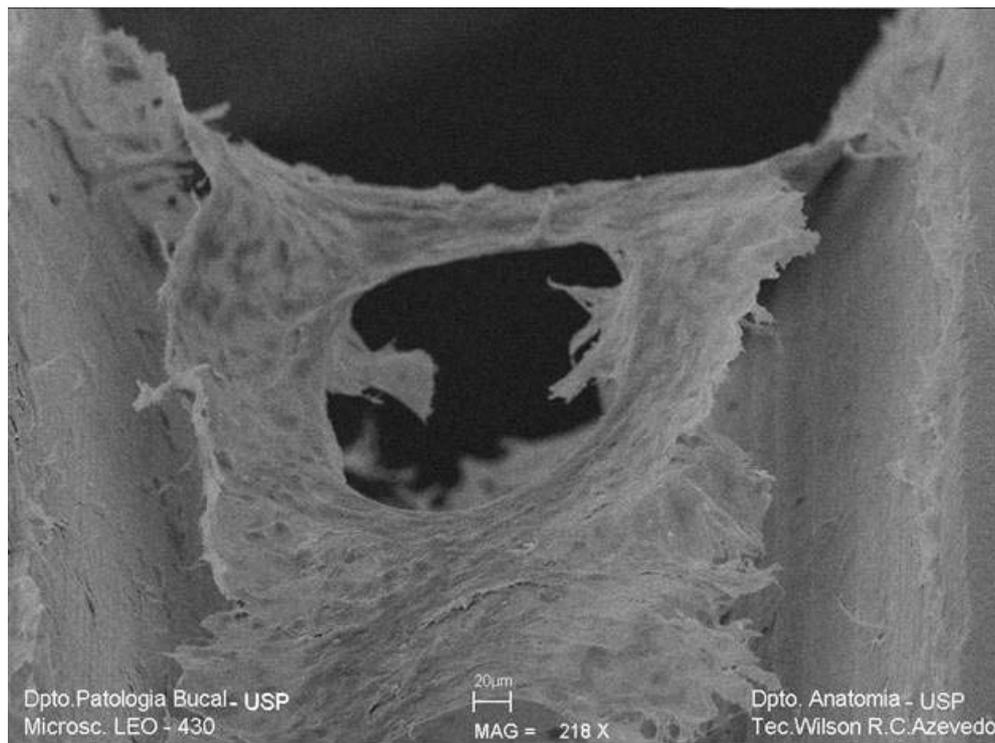


FIGURA 10 - MEV-24 hs com células Osteo-1 aderidas à superfície de Ti usinada (218 x).

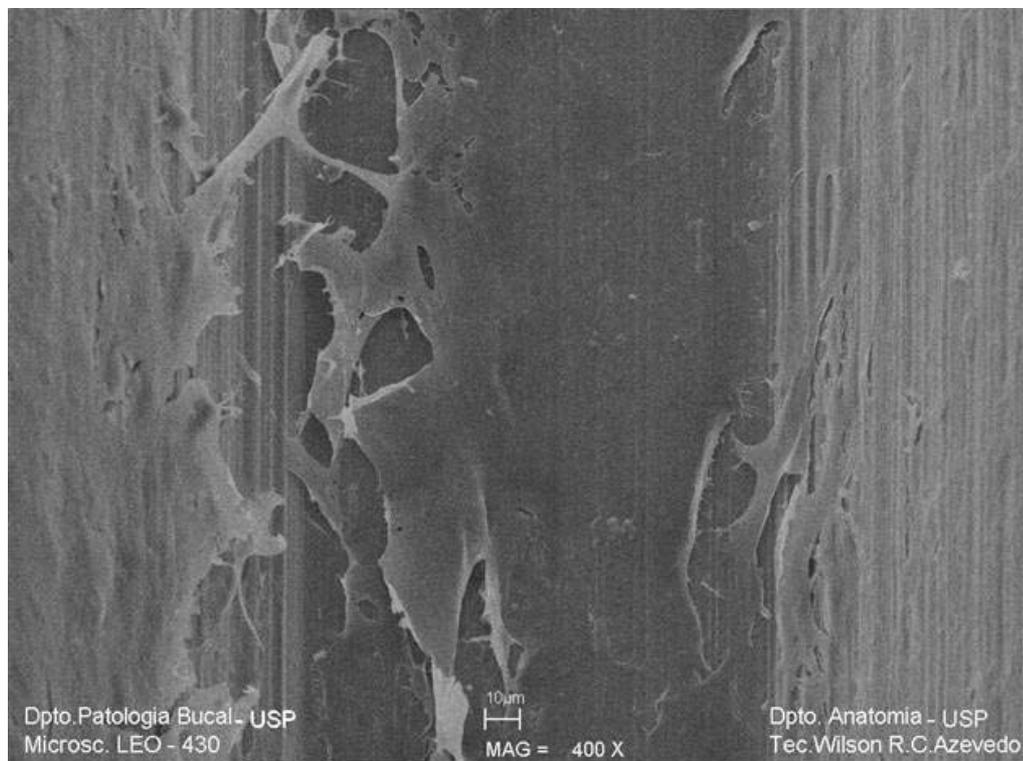


FIGURA 11 - MEV- 48hs, aspecto morfológico das células Osteo-1 (400 x).

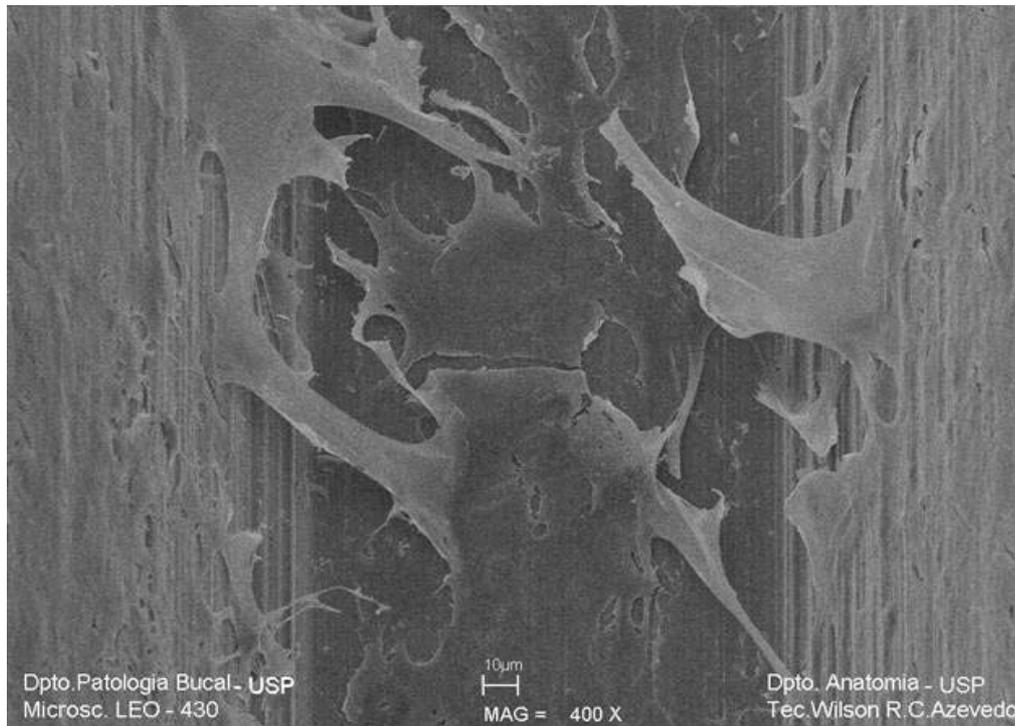


FIGURA 12 - MEV-72 hs, células com corpo grande e plano, espalhadas e proliferadas sobre a superfície de Ti usinada (400 x).



FIGURA 13 - MEV-72 hs, imagem panorâmica de células Osteo-1 proliferadas sobre a superfície do implante usinado (100 x).

6. DISCUSSÃO

Este estudo examinou o efeito da textura de uma superfície de titânio na adesão e proliferação de osteoblastos em cultura de células Osteo-1 e posterior análise ao MEV por um período de 24 a 72 horas. A superfície estudada foi uma superfície lisa, resultante de usinagem em tornos CNC automáticos (Titamax Liso®).

Observamos na literatura muitas publicações relatando a superioridade de superfícies rugosas, submetidas a diferentes procedimentos de tratamento, em relação às superfícies usinadas, quanto ao resultado da osseointegração (THOMAS & COOK, 1985; CARLSSON *et al.*, 1989; BUSER *et al.*, 1991; WENNERBERG *et al.*, 1995; KIESWETTER *et al.*, 1996; KLOKKEVOLD *et al.*, 1997; KIPALDI *et al.*, 1998; LINCKS *et al.*, 1998; BUSER *et al.*, 1999; ELIAS *et al.*, 2005). Entretanto, nosso experimento demonstrou que superfícies usinadas neste trabalho “*in vitro*”, promoveram uma resposta favorável no comportamento celular, como também demonstra a literatura (FRANÇOIS, 1997; PEBÉ *et al.*, 1997).

Tanto em implantes de titânio que receberam tratamentos de superfície para promover diferentes graus de rugosidade quanto em implantes simplesmente usinados, o que entra em contato com o tecido ósseo é o óxido de titânio. E é essa camada superficial de óxido de titânio que fornece a base da excepcional biocompatibilidade dos implantes de titânio (ALBREKTSSON *et al.*, 1981; KASEMO & LAUSMAA, 1986, 1988; ALBREKTSSON *et al.*, 1991; KUMARI *et al.*, 2002). Além disso, um material para ser biocompatível não pode ser citotóxico para os tecidos e células, (WILLIAMS, 1994; WATAHA, 2000; CASSINELLI *et al.*, 2003) sendo que a diminuição da adesão celular é usada como uma medida de toxicidade em trabalhos

que investigam a adesão inicial de células (KUMARI *et al.*, 2002), O implante de titânio usinado utilizado neste estudo permitiu a adesão celular em sua superfície, preservando a integridade destas células (Osteo-1) por um período de observação de 24 a 72 horas, o que lhe confere uma característica de biocompatibilidade e não toxicidade.

Nosso experimento avaliou o comportamento de células parietais de ratos recém-nascidos (Osteo-1) cultivadas sobre implantes de Ti usinados. Os resultados mostraram que eles permitiram adesão, espalhamento e proliferação celulares. Certos autores (COOPER *et al.*, 1998; KUMARI *et al.*, 2002) consideraram que trabalhos “*in vitro*”, com cultura de células oferecem oportunidade única de relacionar aspectos da formação óssea e os efeitos das alterações de superfície dos materiais. Além disso, modelos “*in vitro*” têm o potencial de ajudarem a elucidar eventos na interface osso e implante, fornecendo informações morfológicas, bioquímicas e moleculares a respeito do desenvolvimento osteoblástico e síntese de matriz na interface de diferentes materiais (LINCKS *et al.*, 1998; PULEO & NANJI, 1999). Muitos autores têm demonstrado a importância das proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina, na adesão dos osteoblastos aos biomateriais, bem como o importante papel das integrinas mediando o contato intercelular e entre as células e a matriz extracelular (ANSELME, 2000; TER BRUGGE *et al.*, 2002; TER BRUGGE & JANSEN, 2002). Os efeitos da rugosidade de superfície sobre a adesão celular podem ser apenas ações da rugosidade, ou da reação que ocorre entre o substrato e o soro presente no meio de cultura. Essa interação inicial produz um filme de macromoléculas que modifica as respostas celulares (MARTIN *et al.*, 1995). A fibronectina, uma proteína envolvida na adesão celular, presente no soro, interage com as glicosaminoglicanas e o citoesqueleto, permitindo a adesão e o

espalhamento celulares. Em nossa revisão de literatura constatamos que é possível que uma superfície rugosa possa adsorver fibronectina melhor que uma superfície lisa e, conseqüentemente, promover a adesão de um maior número de células (MARTIN *et al.*, 1995). Entretanto, os dados encontrados na literatura às vezes são conflitantes, pois apesar de certos autores observarem uma maior quantidade de adsorção de fibronectina e adesão celular em superfícies de Ti mais rugosas (DELIGIANI *et al.*, 2001), outros estudos demonstraram redução dos níveis de adsorção de fibronectina “*in vitro*” (FRANÇOIS *et al.*, 1997). ANSELME *et al.* (2000), também observaram menor adesão celular em superfícies rugosas com topografia irregular (jateadas), porém em estudos “*in vitro*” ROSA & BELOTI (2003a, b) demonstraram que o modelo de cultura de células não foi afetada pela rugosidade de superfície do titânio. Em nosso modelo de estudo, podemos afirmar que ocorreu adesão celular sobre a superfície analisada, mas não podemos afirmar que esta adesão deveu-se somente às propriedades de superfície do titânio ou à interação entre as proteínas da matriz extracelular e o substrato.

Com relação à proliferação celular, alguns estudos encontrados na literatura mostraram que superfícies usinadas favorecem a proliferação celular (MARTIN *et al.*, 1995; KIESWETTER *et al.*, 1996). Outros trabalhos observaram maior proliferação celular em superfícies submetidas a tratamento para promover rugosidades (DELIGIANI, 2001; GUIZZARDI *et al.*, 2004; ROUAHI *et al.*, 2006), enquanto outros autores concluíram que não poderiam afirmar claramente o efeito da rugosidade de superfície em relação à proliferação celular (CASTELLANI *et al.*, 1999). A observação da adesão e proliferação de osteoblastos em cultura de células Osteo-1 sobre implantes de titânio com diferentes tipos de rugosidade promovidas somente por jateamento com partículas grandes e por jateamento com partículas

grandes mais condicionamento ácido, demonstraram que ambos os tipos de tratamento promoveram a adesão e proliferação celulares, contudo as células do grupo que sofreu apenas jateamento apresentaram crescimento do primeiro até o último dia do experimento, atingindo confluência total em três dias (ARAÚJO *et al.*, 2001). A observação do comportamento de células de osteossarcoma humano (SaOS) cultivadas em superfícies de titânio usinadas, jateadas com partículas de areia e jateadas com plasma de titânio por um período de 24 a 96 horas, demonstrou que a proliferação celular foi maior em superfícies usinadas. Embora a síntese de proteínas da matriz extracelular, a presença de receptores de integrina e a expressão de fosfatase alcalina tenha sido maior nas superfícies jateadas. A análise da apoptose celular não demonstrou diferenças entre as superfícies, portanto os resultados demonstraram que embora ocorra uma maior proliferação celular em superfícies usinadas, as superfícies rugosas promovem sua diferenciação em fenótipos osteoblásticos secretores (POSTIGLIONE *et al.*, 2003). Encontramos relatos na literatura em relação ao espalhamento celular como sendo uma função essencial da célula que está aderida sobre a superfície e precede a função de proliferação celular para finalmente cobrir a superfície do substrato, sendo que a inibição do espalhamento resulta na involução ou apoptose celular (KUMARI *et al.*, 2002; POSTIGLIONE *et al.*, 2003). Em nosso estudo, observamos que as células Osteo-1, utilizadas na cultura aderiram, espalharam e conseqüentemente proliferaram sobre a superfície usinada durante um período de observação de 72 horas. Foi observado um crescimento celular neste período, sem, entretanto atingir uma confluência total no período estudado, o que nos possibilita dizer que as características da superfície de titânio podem ser um fator determinante no fenômeno de osseointegração

Quanto às características morfológicas das células submetidas à cultura, a literatura nos mostra algumas diferenças substanciais quanto ao formato celular entre superfícies de diferentes texturas. BRUGGE *et al.* (2002) em um estudo comparativo entre diferentes substratos submetidos a cultura com células de osteossarcoma humano (U2OS) encontraram diferenças na adesão, espalhamento, expressão de integrinas e morfologia celular. As células nas superfícies lisas mostraram uma membrana celular com protruções em muitas direções durante a adesão e espalhamento enquanto que as células nas superfícies rugosas mostraram uma membrana celular mais lisa. É suposto que células em superfícies lisas encontrem um número limitado de sítios de adesão e conseqüentemente as extensões membranosas não sejam estabilizadas, ao contrário de superfícies rugosa que permitem que as células encontrem números adequados de sítios de adesão (SMALL *et al.*, 1998). Em substratos rugosos as células, devido à estrutura tridimensional da superfície alcançam uma superfície de contato grande sem necessidade de um esforço lateral para se aderir ao contrário das superfícies lisas onde as células precisam se espalhar para fazer adesão, o que lhes confere um formato grande e plano (TER BRUGGE & JANSEN, 2002). Em nosso experimento, as células demonstraram, quando analisadas ao Mev, um corpo celular compacto, grande, plano (achatado) e com prolongamentos celulares curtos, em concordância com o que tem sido observado na literatura a respeito da interação de células e superfícies lisas (TER BRUGGE & JANSEN, 2002), em contraste com superfícies rugosas, onde apresentam um formato mais alongado ou poligonal e com extensões celulares mais longas (ONG *et al.*, 1996; ARAÚJO *et al.*, 2001; TER BRUGGE *et al.*, 2002).

Pudemos observar também que as células analisadas em nosso

experimento seguiram uma direção paralela às ranhuras da usinagem. A literatura relata esta tendência em implantes usinados (ANSELME *et al.*, 2000b; ELIAS *et al.*, 2005). Superfícies rugosas, sem direção predominante são denominadas isotrópicas e as superfícies usinadas têm características anisotrópicas onde as células seguem o padrão das ranhuras de superfície (LINDHE, 2005).

Nosso experimento, em concordância com a literatura, nos permitiu observar que a adesão e a interação iniciais entre célula e substrato podem ocorrer, independentemente do tratamento utilizado na superfície de titânio. Por outro lado, o comportamento de espalhamento, a morfologia, a proliferação e diferenciação celulares podem ser influenciadas pelas características da superfície. As perspectivas futuras poderão ser a busca de superfícies bioativas, modificadas pela incorporação de biomoléculas nas superfícies dos implantes com o propósito de induzir respostas celulares específicas (PULEO & NANJI, 1999; KUMARI *et al.*, 2002; KROESE *et al.*, 2005; KU *et al.*, 2005; NAYAB *et al.*, 2005; ROVAHI *et al.*, 2006).

7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo e a revisão de literatura permitiram concluir que:

- a) a superfície estudada é biocompatível, pois preservou a integridade das células cultivadas (Osteo-1), analisadas por meio de MEV por um período de 24 a 72 horas, permitindo sua adesão e mantendo suas características morfológicas (formato plano e corpo celular grande e compacto);
- b) pudemos demonstrar em nosso experimento que a superfície usinada analisada ao MEV, permitiu a adesão e a proliferação “*in vitro*” de uma linhagem celular osteoblástica (Osteo-1);
- c) as células neste experimento demonstraram prolongamentos citoplasmáticos curtos e um comportamento anisotrópico, com afinidade pelas ranhuras oriundas da usinagem da superfície de titânio.

ABSTRACT

Previous studies have shown that cell adhesion on titanium surfaces is an important phenomenon in the area of Oral Implantology. The major concern in planning an implant design these days is the production of biocompatible surfaces that promote favorable responses in host cells and tissues. Several in vitro and in vivo studies on osteoblastic adhesion, proliferation and differentiation around implants have shown that different treatments of implant surface may modulate the phenotypical expression and metabolism of osteoblastic cells. The aim of the present study was to assess the in vitro behavior of parietal cells of newborn rats (osteoblast-1) cultured on commercially available implants with machined titanium surface. Three implant samples were immersed in a suspension of osteoblastic cells. After 24, 48, and 72 hours of culture, one sample in each group was prepared for scanning electron microscopic study. The results showed that, for the time period considered the implant allowed cell adhesion and proliferation. Although the literature has shown superiority of rough implant surfaces, regarding osteoblastic adhesion and proliferation, our research showed that the machined surface allowed a favorable response in the in vitro osteoblastic behavior. In conclusion, the results of our research showed that the implant analyzed presented a biocompatible surface, allowing cell integrity and preserving its morphologic characteristics. Our experiment allows us also to conclude that Osteoblast-1 cells presented a short cytoplasmatic extensions and an anisotropic behavior with affinity with the grooves originating from the machining process of the titanium implant surface.

Keywords: Implant surface. Titanium. Biocompatibility. Cell culture.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS²

1. Adell R, Lekholm U, Rockler B et al. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **Int J Oral Surg** 1981 Dec; 10(6): 387-416.
2. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA et al. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. **Acta Orthop Scand** 1981; 52(2): 155-70.
3. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P et al. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. **Int J Oral Maxillofac Implants** 1986 Summer; 1(1): 11-25.
4. Albrektsson T. The response of bone to titanium implants. **CRC Crit Rev Biocompat** 1985; 1: 53-84.
5. Anselme K, Bigerelle M, Noel B et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. **J Biomed Mater Res** 2000 Feb; 49(2): 155-66.
6. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials** 2000 Apr; 21(7): 667-81.
7. Araújo NS, Jaegler RG, Todescan FF et al. Teste de cultura celular para avaliar a adesão e proliferação sobre implantes de titânio com superfícies modificadas. **RPG Rev Pós-Grad** 2001; 8(2): 103-9.
8. Brånemark PI, Breine U, Adell R et al. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I: Experimental studies. **Scand J Plast Reconstr Surg** 1969; 3(2): 81-100.
9. Brånemark PI. An introduction to osseointegration. In: Brånemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. **Osseointegration in clinical dentistry**. Chicago: Quintessence; 1983. p. 11-53.

² De acordo com o Manual de Normalização para Dissertações e Teses da Faculdade de Odontologia e Centro de Pós-Graduação São Leopoldo Mandic baseado no modelo Vancouver de 1997, e abreviatura dos títulos de periódicos em conformidade com o Index Medicus.

10. Brånemark P-I, Hansson BO, Adell R et al. Osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scand J Plas Reconstr Surg Hand Surg** 1977; 11(Suppl 16): 1-132
11. Brånemark PI. Vital microscopy of bone marrow in rabbit. **Scand J Clin Lab Invest** 1959; 11(Suppl 38): 1-82.
12. Buser D, Nydegger T, Oxland T et al. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. **J Biomed Mater Res** 1999 May; 45(2): 75-83.
13. Buser D, Schenk RK, Steinemann S et al. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. **J Biomed Mater Res** 1991 July; 25(7): 889-902.
14. Carlsson L, Rostlund T, Albrektsson B et al. Removal torques for polished and rough titanium implants. **Int J Oral Maxillofac Implants** 1988 Spring; 3(1): 21-4.
15. Castellani R, Ruijter A, Renggli H et al. Response of rat bone marrow cells to differently roughened titanium discs. **Clin Oral Implants Res** 1999 Oct; 10(5): 369-78.
16. Cassinelli C, Morra M, Bruzzone G et al. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 2. In vitro experiments. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2003 Jan-Feb; 18(1): 46-52.
17. Cooper LF, Masuda T, Whitson SW et al. Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. **Int J Oral Maxillofac Implants** 1999 Jan-Feb; 14(1): 37-47.
18. Cooper LF, Masuda T, Yliheikkilä PK et al. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. **Int J Oral Maxillofac Implants** 1998 Mar-Apr; 13(2): 163-74.
19. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. **J Dent Educ** 2003 Aug; 67(8): 932-49.
20. Deligianni DD, Katsala N, Ladas S et al. Effect of roughness of titanium alloy Ti – AL6 –V4 on human bone marrow cell response and protein adsorption. **Biomaterials** 2001; 22(11): 1251-1260.

21. Den Braber ET, Ruijter JE, Smits HT et al. Effect of parallel surface microgrooves and surface energy on cell growth. **J Biomed Mater Res** 1995 Apr; 29(4): 511-8.
22. Elias CN, Lima JHC, Figueira DC. Implantes dentários com superfícies anisotrópicas e isotrópicas. **Rev Bras Implantodon** 2005; 11(1): 9-12.
23. François P, Vaudaux P, Taborelli M et al. Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (II) Adsorption isotherms and biological activity of immobilized fibronectin. **Clin Oral Implants Res** 1997 June; 8(3): 217-25.
24. Guizzardi S, Galli C, Martini D et al. Different titanium surface treatment influences human mandibular osteoblast response. **J Periodontol** 2004 Feb; 75(2): 273-82.
25. Ingber DE, Dike L, Hansen L et al. Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis. **Int Rev Cytol** 1994; 150: 173-224.
26. Kasemo B, Lausmaa J. Biomaterial and implant surface: on role of cleanliness, contamination, and preparation procedures. **J Biomed Res** 1988 Aug; 22(A2 Suppl): 145-58.
27. Kasemo B, Lausmaa J. Biomaterials and implant surface: a surface science approach. **Int J Oral Maxillofac Implants** 1988; 3(2):247-259.
28. Kasemo B, Lausmaa J. Metal selection and surface characteristics. In: Brånemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. **Osseointegration in clinical dentistry**. Chicago: Quintessence; 1985, p. 99-116.
29. Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD et al. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. **Crit Rev Oral Biol Med** 1996; 7(4): 329-45.
30. Kilpadi DV, Lemons JE. Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. **J Biomed Mater Res** 1994 Dec; 28(12): 1419-25.
31. Klokkevold PR, Nishimura RD, Adachi M et al. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. **Clin Oral Implants Res** 1997 Dec; 8(6): 442-7.

32. Kroese-Deutman HC, Van Den Dolder J, Spauwen PH et al. Influence of RGD-loaded titanium implants on bone formation in vivo. **Tissue Eng** 2005 Nov-Dec; 11(11-12): 1867-75.
33. Ku Y, Chung CP, Jang JH. The effect of the surface modification of titanium using a recombinant fragment of fibronectin and vitronectin on cell behavior. **Biomaterials** 2005 Sept; 26(25): 5153-7.
34. Kumari TV, Vasudev U, Kumar A et al. Cell surface interactions in the study of biocompatibility. **Trends Biomater** 2002; 15(2): 37-41.
35. Lampin M, Warocquier-Clerout, Legris C et al. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. **J Biomed Mater Res** 1997 July; 36(1): 99-108.
36. Lim YJ, Oshida Y, Andres CJ et al. Surface characterizations of variously treated titanium materials. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2001 May-June; 16(3): 333-42.
37. Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR et al. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. **Biomaterials** 1998 Dec; 19(23): 2219-32.
38. Lindhe J. Topography and titanium surfaces In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. **Clinical periodontology and implant dentistry**. Copenhagen: Blackwell Munksgaard; 2003, p. 799-806.
39. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). **J Biomed Mater Res** 1995 Mar; 29(3): 389-401.
40. McFarland CD, Thomas CH, DeFilippis C et al. Protein adsorption and cell attachment to patterned surfaces. **J Biomed Mater Res** 2000 Feb; 49(2): 200-10.
41. Nayab SN, Jones FH, Olsen I. Effects of calcium ion implantation on human bone cell interaction with titanium. **Biomaterials** 2005 Aug; 26(23): 4717-27.
42. Ogawa T, Nishimura I. Different bone integration profiles of turned and acid-etched implants associated with modulated expression of extracellular matrix genes. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2003 Mar-Apr; 18(2): 200-10.

43. Ong JL, Prince CW, Raikar GN et al. Effect of surface topography of titanium on surface chemistry and cellular response. **Implant Dent** 1996 Summer; 5(2): 83-88.
44. Ozawa S, Kasugai S. Evaluation of implant materials (hydroxyapatite, glass-ceramics, titanium) in rat bone marrow stromal cell culture. **Biomaterials** 1996 Jan; 17(1): 23-9.
45. Pebe P, Barbot R, Trinidad J et al. Countertorque testing and histomorphometric analysis of various implant surfaces in canines: a pilot study. **Implant Dent** 1997 Winter; 6(4): 259-65.
46. Postiglione L, Di Domenico G, Ramaglia L et al. Behavior of SaOS-2 cells cultured on different titanium surfaces. **J Dent Res** 2003 Sept; 82(9): 692-6.
47. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. **Biomaterials** 1999 Dec; 20(23-24): 2311-21.
48. Rich A, Harris AK. Anomalous preferences of cultured macrophages for hydrophobic and roughened substrata. **J Cell Sci** 1981 Aug; 50: 1-7.
49. Rosa AL, Beloti MM. Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. **Braz Dent J** 2003b; 14(1): 16-21.
50. Rosa AL, Beloti MM. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. **Clin Oral Implants Res** 2003a Feb; 14(1): 43-8.
51. Rouahi M, Champion E, Hardouin P et al. Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials. **Biomaterials** 2006 May; 27(14): 2829-44.
52. Sennerby L, Thomsen P, Ericsson LE. Early tissue response to titanium implants inserted in rabbit cortical bone. Part II. Ultrastructural observations. **J Mat Sci: Materials in Medicine** 1993; 4: 494-502.
53. Small JV, Rottner K, Kaverina I et al. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. **Biochim Biophys Acta** 1998 Sept 16; 1404(3): 271-281.

54. Steflik DE, Sisk AL, Parr GR et al. Transmission electron and high-voltage electron microscopy of osteocyte cellular processes extending to the dental implant surface. **J Biomed Mater Res** 1994 Sept; 28(9): 1095-107.
55. Ter Brugge PJ, Dieudonne S, Jansen JA. Initial interaction of U2OS cells with noncoated and calcium phosphate coated titanium substrates. **J Biomed Mater Res** 2002b Sept; 61(3): 399-407.
56. Ter Brugge PJ, Jansen JA. Initial interaction of rat bone marrow cells with non-coated and calcium phosphate coated titanium substrates. **Biomaterials** 2002a Aug; 23(15): 3269-77.
57. Thomas KA, Cook SD. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. **J Biomed Mater Res** 1985 Oct; 19(8): 875-901.
58. Wataha JC. Biocompatibility of dental casting alloys: a review. **J Prosthet Dent** 2000 Feb; 83(2): 223-34
59. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B et al. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. **Clin Oral Implants Res** 1995 Mar; 6(1): 24-30.
60. Williams DF. Implants in dental and maxillofacial surgery. **Biomaterials** 1981a July; 2(3): 133-46.
61. Williams DF. Titanium: epitome of biocompatibility or cause for concern. **J Bone Joint Surg Br** 1994 May; 76(3): 348-9.
62. Zarb GA. ed. Proceedings of the Toronto Conference on Osseointegration in Clinical Dentistry, 1982.

ANEXO



SÃO LEOPOLDO MANDIC
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Aprovado pelo CEP

Campinas, 14 de Agosto de 2004.

A(o)

C. D. Sandra de Carvalho Fabiano Alves

Curso: Implantodontia

Prezado(a) Aluno(a):

O projeto de sua autoria "*Avaliação in vitro da adesão e proliferação de osteoblastos sobre implantes Osseointegráveis com superfície Usinada (Titamax Liso®)*".

Orientado pelo(a) Prof(a) Dr(a) Thomaz Wassall

Entregue na Secretaria de Pós-graduação do CPO - São Leopoldo Mandic, no dia 15/07/2005, com número de protocolo nº 06/288, foi APROVADO pelo Comitê de Ética e Pesquisa instituído nesta Universidade de acordo com a resolução 196 /1.996 do CNS - Ministério da Saúde, em reunião realizada no dia 20/07/2005.

Cordialmente

Coordenador de Pós-Graduação
Prof. Dr. Thomaz Wassall