

UNIVERSIDADE VEIGA DE ALMEIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA

Cláudia Gomes de Paiva

ANÁLISE DO COMPORTAMENTO, VIABILIDADE E CRESCIMENTO DE
OSTEOBLASTOS HUMANOS CULTIVADOS EM SUPERFÍCIES DE TITÂNIO
COM DIFERENTES TOPOGRAFIAS

Rio de Janeiro
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Cláudia Gomes de Paiva

Mestrado profissional em odontologia

Área de concentração: Reabilitação Oral

**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO, VIABILIDADE E CRESCIMENTO
DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS CULTIVADOS EM SUPERFÍCIES
DE TITÂNIO COM DIFERENTES TOPOGRAFIAS**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Mestrado Profissional em Odontologia da Universidade Veiga de Almeida, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Odontologia.

ORIENTADOR: Prof^o. Dr. Antônio Canabarro

Rio de Janeiro
2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cláudia Gomes de Paiva

ANÁLISE DO COMPORTAMENTO, VIABILIDADE E CRESCIMENTO DE OSTEOLASTOS HUMANOS CULTIVADOS EM SUPERFÍCIES DE TITÂNIO COM DIFERENTES TOPOGRAFIAS

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Mestrado Profissional em Odontologia da Universidade Veiga de Almeida, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Odontologia.

Aprovada em 16 de dezembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr. Antônio Canabarro
Universidade Veiga de Almeida

Prof^a Dra. Adriana Brandão Ribeiro Linhares
Universidade Federal Fluminense

Prof^a Dra. Beatriz Tholt
Universidade Veiga de Almeida

UNIVERSIDADE VEIGA DE ALMEIDA
SISTEMA DE BIBLIOTECAS
Rua Ibirutuna 108 – Maracanã
20271-020 – Rio de Janeiro - RJ
Tel: (21) 2574-8845 Fax: (21) 2574-8891

FICHA CATALOGRÁFICA

P149a Paiva, Cláudia Gomes de
Análise do comportamento, viabilidade e crescimento de osteoblastos humanos cultivados em superfícies de titânio com diferentes topografias, 2010.
33f. ; 30 cm.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Veiga de Almeida, Mestrado em Odontologia, Reabilitação Oral, Rio de Janeiro, 2010.

Orientador: Prof . Dr Antonio Canabarro

1. Biomaterial. 2. Titânio. I. Canabarro, Antonio. II. Universidade Veiga de Almeida, Mestrado em Odontologia, Reabilitação Oral. II. Título.

CDD – 617.692
Bireme

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial Tijucal/UVA

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UVA
Biblioteca Maria Anunciação Almeida de Carvalho

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar as características topográficas de amostras de titânio submetidas a tratamentos distintos e estudar a viabilidade de células osteoblásticas humanas cultivadas sobre as diferentes superfícies. Três superfícies foram preparadas com diferentes topografias: lixada (controle-C-Ti), com ataque ácido (A-Ti) e jateada com óxido de alumina e ataque ácido (SLA-Ti). A topografia de 100 amostras de cada superfície foi analisada no AFM no modo contato. A superfície C-Ti foi a mais lisa (Ra: 195.18 nm, Rms: 240.79 nm) e anisotrópica. O tratamento químico em A-Ti removeu as ranhuras paralelas produzidas pelo processo de lixamento e criou uma superfície com rugosidade intermediária (Ra em torno de 0,3 μm , 1.6 vezes maior que C-Ti [Ra: 321.16 nm, Rms: 401.67]), porém bastante homogênea e isotrópica. O tratamento físico-químico em SLA-Ti criou superfícies mais rugosas (Ra em torno de 0,5 μm , três vezes mais rugosa que C-Ti [Ra: 519.02, Rms: 637.22]), com picos, vales mais acentuados, também isotrópicas. Posteriormente, células osteoblásticas foram cultivadas por 4 e 24 hs sobre cada amostra e analisadas em MEV. Após cada período, a quantidade de células viáveis aderidas foi estimada usando um kit comercial Cytotox, que permitiu avaliar a atividade mitocondrial (XTT), a integridade da membrana (VN) e a densidade (número) de células (CVDE). Após 4 hs a A-Ti apresentou um aumento significativo sobre a atividade mitocondrial (XTT) e a densidade de células (CVDE) comparado a C-Ti e SLA-Ti. Depois de 24 hs, não houve diferença estatística entre SLA-Ti e C-Ti, mas ambas apresentaram uma significativa redução em CVDE quando comparadas à superfície A-Ti. Baseado nesses resultados pode-se concluir que algumas características da superfície com tratamento ácido (A-Ti), como valores moderados de amplitude de rugosidade, picos e vales homogêneos em baixa escala, distribuídos de maneira uniforme sem uma direção predominante, aumentaram o número de células aderidas após 4 e 24h e a atividade mitocondrial após 4h.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate the topografics characteristics of titanium samples submitted to distinct treatments and study the human osteoblasts cells viability,growed on different surfaces. Three surfaces were prepared with different topographies: grounded (control C-Ti), acid-etched (A-Ti), Alumina blasted and acid-etched (SLA-Ti). The surface topography of 100 samples was evaluated in AFM, on contact mode. The C-ti surface were the most smooth ($Ra \approx 0.2 \mu m$) and anisotropic. The acid treatment A-Ti remove the parallel ridges produced by the ground process and create an intermediate roughness surface ($Ra \approx 0,3 \mu m$, 1.6 times bigger than C-Ti) , despite too much homogeneous and isothropic. The chemistry – physical treatment in SLA-Ti create rough surfaces ($Ra \approx 0.5 \mu m$, three times rougher than C-Ti), with sharp peaks and valleys but isothropic. Posteriorly,osteoblasts cells were growed for 4 and 24hs on each sample and evaluate in MEV. After each time , the quantity of the adhesion viable cells were estimated using a commercial Kit Cytotox, which allowed evaluate the mitochondrial activity (XTT), the membrane integrity (NR) and cells density (CVDE). After 4hs A-Ti showed a significative increase of the mitochondrial activity (XTT) and density (CVDE), compared to C-Ti and SLA-Ti. After 24hs, SLA-Ti and C-Ti didn't have statistic difference, but both showed a significative reduction in CVDE when compared with A-Ti surface. Based in these results, we can conclude that some characteristics of acid surface (A-Ti), with moderate values of roughness, homogeneous peaks and valleys and low measure, distributed in uniform manner without a predominant direction, increase the adhesion cells number after 4 and 24 hs and the mitochondrial activity after 4 hs.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO, p.10

2. OBJETIVO DO TRABALHO, p.12

3. MATERIAL E MÉTODOS, p.13

3.1 Preparação das superfícies de Titânio, p.13

3.2 Análise da topografia das superfícies, p.14

3.3 Cultura de células, p.14

3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), p.15

3.5 Ensaio de Adesão, p.16

3.6 Análise Estatística , p.17

4. RESULTADOS, p.18

4.1 Características topográficas das amostras de Ti, p.18

5. DISCUSSÃO, p.26

6. CONCLUSÃO, p.32

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.33

LISTA DE ABREVIATURAS

μm	Micrômetro
$\mu\text{m/s}$	Micrômetro por segundo
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μl	Microlitro
A-Ti	Superfície de titânio tratada por ácido
AFM	Microscópio de força atômica
Al_2O_3	Óxido de alumina
atm	Atmosfera
CO_2	Gás carbônico
C-Ti	Superfície de titânio lixada controle
CVDE	Eluição de corante violeta cristal
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HF	Ácido Fluorídrico
HOAL	Células osteoblásticas da paciente Aline
J	Jato
kPa	Quilopascal
L	Lixa
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mL	Mililitro
mg/mL	Miligrama por mililitro
nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato de sódio
Ra	Valor médio da variação de altura
Rms	Raiz quadrada da média temporal da distância vertical entre o gráfico e o Eixo horizontal mede maior área de contato da rugosidade.
Sa	Rugosidade média medida pelo microscópio de força atômica
SFB	Soro bovino fetal
SiC	Carboneto de silício
Si_3N_4	Nitreto de silício
SLA	Ti- superfície de titânio jateada e tratada por ácido
Ti grau II	Titânio comercialmente puro cp
UFF	Universidade Federal Fluminense
VN	Vermelho Neutro
XTT	Hidróxido de tetrazólio

AGRADECIMENTOS

Um trabalho dessa amplitude não se pode completar sem ajuda de profissionais e amigos.

A parte visível não dá uma idéia exata da grandeza da colaboração do todo.

Gostaria de expressar meus agradecimentos àqueles que colaboraram de uma forma ou de outra para a confecção deste trabalho.

À Universidade Veiga de Almeida por ter me proporcionado o curso de pós-graduação.

Ao meu professor orientador Antônio pelo tema, ajuda na condução e paciência.

À professora Beatriz Tholt pela dedicação em suas aulas e auxílio no AFM

Ao Rodrigo Prioli, do Departamento de Física da PUC, por ter disponibilizado gentilmente o AFM e pela orientação na parte escrita referente a este método.

Ao Dr. José Mauro Granjeiro por ter disponibilizado o uso do Laboratório de Cultura de Células da UFF.

À Adriana Linhares e Gutemberg do Laboratório de Cultura de Células da UFF, por terem me recebido tão bem e terem nos ajudado em toda a parte biológica do experimento.

A todos os meus professores do curso por terem me auxiliado no crescimento profissional.

Aos meus colegas do mestrado pelos momentos de estudo e lazer juntos.

Dedico esta dissertação em especial ao meu noivo Italo Parente de Barros, quase marido, pela compreensão de minha ausência, por estar ao meu lado sempre que preciso e pela correção gramatical.

À minha mãe que me ensinou a acreditar e valorizar a vida por tudo aquilo que ela pode nos proporcionar.

1. INTRODUÇÃO

A biocompatibilidade de um material está estreitamente relacionada com a resposta fisiológica da célula em contato com a sua superfície. Os fenômenos de interação entre células e substratos podem ser definidos de forma bastante abrangente, como mecanismos pelos quais as células são capazes de responder a estímulos do meio ambiente externo e como estes influenciam sua adesão, proliferação e diferenciação (ANSELME 2000). A configuração em micro escala imposta pelos tratamentos com ácidos às superfícies de implantes, como no presente trabalho, parece induzir uma elevação na retenção de fibrina aumentando o recrutamento de células osteogênicas, diferenciação e condução fornecendo um caminho para a superfície do implante, onde ocorre o espraiamento através de prolongamentos citoplasmáticos e formação de matriz orgânica (ELIAS 2001; WAEL, 2007).

O Titânio tem sido usado nos últimos 20 anos como biomaterial em odontologia e ortopedia, por causa de suas excelentes propriedades mecânicas, resistência à corrosão e biocompatibilidade com o tecido vivo.

Sabe-se que determinadas variáveis, como topografia, rugosidade e porosidade da superfície influenciam no travamento mecânico, enquanto a capacidade de adsorção de proteínas e células osteoblásticas dos implantes tem influência na proliferação, diferenciação, síntese de matriz óssea, produção de fatores de crescimento, citocinas, aderência e espalhamento celular. Por este motivo, há uma necessidade de amplos estudos para se alcançar a biocompatibilidade gerando ósseointegração.

Sendo assim, os tratamentos de superfície têm sido empregados com o intuito de favorecer a resposta biológica e a adesão celular nos estágios iniciais da ósseointegração. Estudos *in vivo* e *in vitro* sustentam a hipótese de que superfícies rugosas além de promover melhor fixação do implante em relação a superfícies lisas, estimulam a aderência de células precursoras osteoblásticas, sua proliferação e diferenciação em osteoblastos, produção de matriz extracelular não mineralizada (tecido osteóide), calcificação desta matriz e o aumento da expressão da fosfatase alcalina.

Quando o protocolo para ósseointegração foi estabelecido por Branemark entre 3 e 6 meses os primeiros implantes de superfícies usinadas eram minimamente rugosos, com o desenvolvimento das superfícies tratadas tornou-se possível o carregamento imediato dos implantes sem comprometer a ósseointegração.(BECKER *et al* 1997; ERICSSON 2002)

Hoje em dia a carga imediata é uma realidade, a reanálise do período de cicatrização proposto por Branemark surgiu das crescentes necessidades clínicas, portanto o processo de cicatrização e formação óssea nos estágios iniciais, deve ser amplamente pesquisado para ser compreendido e com isso obtermos os melhores resultados na longevidade dos trabalhos realizados.

Embora, existam muitos trabalhos publicados sobre rugosidade de superfície, muitas vezes contraditórios em relação à sua influência na adesão celular, ainda é difícil definir o que é rugoso ou liso, uma vez que não é seguido um padrão em todos os trabalhos. Le Guehenec *et al* fizeram uma revisão de literatura em 2007 e concluíram que a rugosidade na superfície aumenta a ósseointegração (contato osso / implante) e o travamento mecânico, embora o exato papel da química e topografia nos eventos mais precoces ainda seja pobremente entendido.

2. OBJETIVO DO TRABALHO

O objetivo do trabalho foi à análise descritiva das topografias das superfícies de Titânio em AFM, submetidas a diferentes tratamentos e análise em MEV da viabilidade e comportamento de células osteoblásticas humanas cultivadas sobre estas superfícies em 4 e 24 hs.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação das superfícies de Titânio

Uma placa de Titânio (Ti) grau II (Ti Brasil, SP, Brasil) com 250 x 250 mm de lado e 1 mm de espessura foi submetida a tratamentos mecânico e químico, no Laboratório de engenharia Mecânica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Primeiro, a placa de Ti foi submetida a jateamento (J) usando partículas de óxido de alumina (Al_2O_3) com diâmetro médio de 65 μm , pressão de jateamento (sucção – indireta) 414 kPa (ou 4 atm), distância do bico para a chapa 30 cm, e ângulo de $60^\circ \pm 10$, por 1 minuto . A placa então foi cortada em amostras de 9 x 9 mm², e posteriormente limpas em ultra-som (banhos de 10 minutos cada, usando em seqüência acetona, álcool 70 % e água destilada). Posteriormente, as amostras eram submetidas a tratamento químico com solução de ácido fluorídrico (HF). O tratamento químico foi feito em dois estágios: primeiro usou-se uma solução de HF a 4% durante 60 s e depois uma solução contendo HF a 4% mais H_2O_2 a 8% por mais 15 s, para passivação das superfícies. Ambos os estágios de tratamento químico foram feitos na temperatura ambiente, em cabine apropriada, com exaustão. Trinta amostras de superfícies SLA (submetidas a tratamentos J + HF) foram usadas no estudo.

Outra placa de Ti foi cortada em amostras de 9 x 9 mm² e foi submetida a tratamento com lixa (L - 600 SiC) por 10 segundos, sob água corrente. Trinta amostras de superfície L foram usadas como controle. Outras quarenta e duas amostras da superfície L receberam um tratamento químico adicional, com HF, em dois estágios, como as superfícies SLA, formando um terceiro grupo de amostras (Ácida – A).

Todas as amostras foram novamente ultrasonicamente limpas, conforme descrito anteriormente, e esterilizadas em autoclave por 20 min a 120⁰ C.

3.2 Análise da topografia das superfícies

A análise foi realizada com o uso de um microscópio de força atômica (AFM, Nanoscope IIIa Multimode). Durante a análise, o microscópio foi operado no modo de contato. Uma ponta Si_3N_4 com constante de mola $k = 0,075 \text{ N/m}$, foi usada.

Neste modo operacional, o microscópio foi regulado para manter a distância entre a ponta e a superfície da amostra constante durante a varredura. Em nosso estudo, uma frequência de 0.5 Hz equivalente a $40 \mu\text{m/s}$ foi utilizada para varrer uma área de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$.

Com as imagens do AFM a rugosidade média de superfície (R_a) e (R_{ms}) foram calculadas.

3.3 Cultura de células

Células osteoblásticas humanas (HOAL) foram extraídas de explantes de osso proveniente de procedimento cirúrgico ortopédico, realizado no Hospital Antônio Pedro de Niterói, sob supervisão do Comitê de Ética do Hospital Universitário da UFF, seguindo método padrão.

Após a coleta, as amostras (explantes) foram lavadas exaustivamente em tampão fosfato de sódio (PBS) e cortadas em pequenos pedaços, com aproximadamente 1cm de diâmetro. Em seguida os explantes foram transferidos para um elermeyer e tratados com colagenase 1A ($1,0\text{mg/mL}$). Foram feitas duas imersões em colagenase 1A, 1 e 2hs respectivamente, a 37°C sob agitação lenta.

A atividade da colagenase foi inibida pela adição de meio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Os explantes foram novamente lavados em PBS e transferidos para garrafas plásticas de cultivo, de 25 cm^2 (Corning; New Jersey, EUA). A cada garrafa contendo um único fragmento ósseo foi adicionado um pequeno volume de meio DMEM suplementado com SFB e antibióticos (100mL de penicilina e $100 \mu\text{g/mL}$ de estreptomicina). O meio foi adicionado de modo a banhar somente a base do

explante evitando assim a flutuação do mesmo, o que impediria a migração das células do osso para a garrafa.

Os explantes eram mantidos em estufa a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Somente no terceiro dia de manutenção do cultivo, quando os fragmentos já estavam presos ao fundo das garrafas, foram adicionados cuidadosamente, volumes maiores de meio DMEM.

Todo o processo de obtenção da cultura primária foi realizado de modo asséptico.

Com a migração das células e formação de monocamadas confluentes, os explantes foram retirados e passados para novas garrafas, reiniciando o processo de obtenção das culturas primárias como descrito anteriormente. As células em confluência (sem o explante) foram repicadas através de um tratamento com tripsina/ EDTA (Gibco) por 10 min. Após este tempo as células eram centrifugadas a 360g durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi re-suspendido em meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de soro bovino sem antibióticos. Esta suspensão foi subcultivada sobre as amostras de Ti, em placas de 24 poços (Falcon, Franklin Lakes, NJ), todas contendo 500 µl em meio de cultura e uma densidade de $8,5 \times 10^3$ células/ cm² com 20.000 células por unidade.

3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os osteoblastos foram cultivados por 4 e 24 horas, sobre cada amostra, e analisadas MEV (Jeol JSM-5310, MA). Três amostras de cada grupo foram estudadas. Após cada período, as amostras contendo as células foram fixadas por 30 minutos, usando fixador Karnovsky (4% de paraformaldeído e 2.5% de glutaraldeído) em tampão cacodilato de sódio 0,1M com pH 7.4, em temperatura ambiente. As amostras eram pós-fixadas em tetróxido de Osmium a 1% em tampão cacodilato por 20 minutos, a etapa da desidratação foi realizada de forma bem lenta, com concentrações crescentes de etanol: 15, 30, 50, 70, 90, 95, e 100% por três vezes. A secagem do material foi feita pelo método do ponto crítico com CO₂, em um aparelho Balzers CDP-20 (Balzers Union, Fürstentun, Liechstenstein). Em seguida as amostras foram montadas em suportes especiais

e cobertas com um filme de ouro durante um minuto, em um metalizador Balzers (Balzers Union). O material foi observado em MEV. As imagens foram obtidas com diferentes ampliações. Os campos eram escolhidos aleatoriamente. As imagens digitais resultantes foram armazenadas para observação.

3.5 Ensaio de Adesão

Subculturas de células osteoblásticas humanas, na segunda passagem, foram encubadas a 37°C, em estufa apropriada, contendo 5% de CO₂ e 95% de ar. Após 4 ou 24 hs, a quantidade de células viáveis aderidas, foi estimada através de três parâmetros de viabilidade celular, conhecidos por estarem diretamente relacionados à quantidade de células presentes (Scudiero 1988, Winckler 1974, Kueng 1989). Para isso foi utilizado um kit comercial (Cytotox, Xenometrix, Alemanha), que permite avaliar: (1) a atividade mitocondrial (XTT); (2) integridade da membrana (vermelho neutro) e (3) densidade de células (cristal violeta CVDE).

Este kit é especialmente interessante porque permite o estudo destes três parâmetros diferentes, que de maneira geral avalia a sobrevivência e a integridade celular, usando a mesma amostra. O XTT é um teste de atividade celular que se baseia na habilidade de enzimas mitocondriais desidrogenases, em converter o corante amarelo de tetrazólio, solúvel em água, em compostos também solúveis de formazan, com coloração laranja. A absorbância desta solução final é medida a 480 nm (SCUDIERO 1988), usando um espectrofotômetro UV/Vis para microplacas (PowerWave MS2, BioTek Instruments, USA). VN é um teste de viabilidade/sobrevivência celular que se baseia na capacidade de células viáveis, *i.e.* com membranas intactas, de incorporar o corante VN em seus lisossomas, onde ele se acumula (Winckler 1974). A quantidade de corante acumulado pode ser medida a 540 nm. Por fim, o CVDE é um teste simples, que avalia a densidade celular através da coloração do DNA; após a eliminação do excesso de corante, a absorbância a 540 nm é proporcional à quantidade de células presentes na amostra, viáveis ou não (KUENG 1989).

3.6 Análise Estatística

Os dados do presente trabalho estão apresentados em média e desvio-padrão. Inicialmente, foi estudada a distribuição dos dados com o teste Kolmogorov-Smirnov. Caso os dados apresentassem distribuição normal, o teste ANOVA era realizado e quando a hipótese nula era rejeitada, os dados eram comparados usando teste (post-hoc) Duncan. Caso os dados apresentassem distribuição não normal, era utilizado o teste Kruskal-Wallis. Havendo diferença estatística entre os 3 grupos, era utilizado o teste Mann-Whitney para estudar pares de grupos. O erro tipo I (alfa) foi estabelecido em 0.05. Foi utilizado o SPSS 11.0 (SPSS Inc. Chicago) para analisar os dados. Os dados biológicos são resultado de dois experimentos realizados em separado em triplicata (cada).

4. RESULTADOS

4.1 Características topográficas das amostras de Ti

Os valores médios de Ra e Rms são mostrados na tabela 1. Os valores obtidos de Ra e Rms após análise de 100 imagens de cada amostra mostraram diferenças estatisticamente significantes entre as superfícies de titânio estudadas. O C-Ti foi o mais liso; a superfície SLA-Ti foi a mais rugosa (Ra e Rms), com valores aproximadamente três vezes maiores do que a superfície controle (C-Ti), enquanto que a superfície A-Ti apresentou valores de rugosidade intermediária, aproximadamente 1.6 vezes maiores do que o C-Ti (tabela 1).

Tabela 1 - Valores médios do parâmetro de rugosidade e área de superfície das diferentes superfícies de titânio

Ti Surfaces	Ra (nm)* Mean (SD)	Rms (nm)** Mean (SD)
C-Ti	195.18 (91.57)	240.79 (106.42)
A-Ti	321.16 (124.93)	401.67 (146.94)
SLA-Ti	519.02 (121.10)	637.22 (137.63)

*Ra: One-way ANOVA; F= 472.84, p<0.000, Duncan: SLA-Ti>A-Ti>C-Ti.

**Rms: Kruskal-Wallis; p<0.000, Mann-Whitney: SLA-Ti>A-Ti>C-Ti.

Pode-se observar que as três superfícies apresentam características topográficas distintas. A Superfície C-Ti apresenta ranhuras bem visíveis, seguindo uma orientação específica (Fig. 1- imagens obtidas no AFM em 2D e 3D)

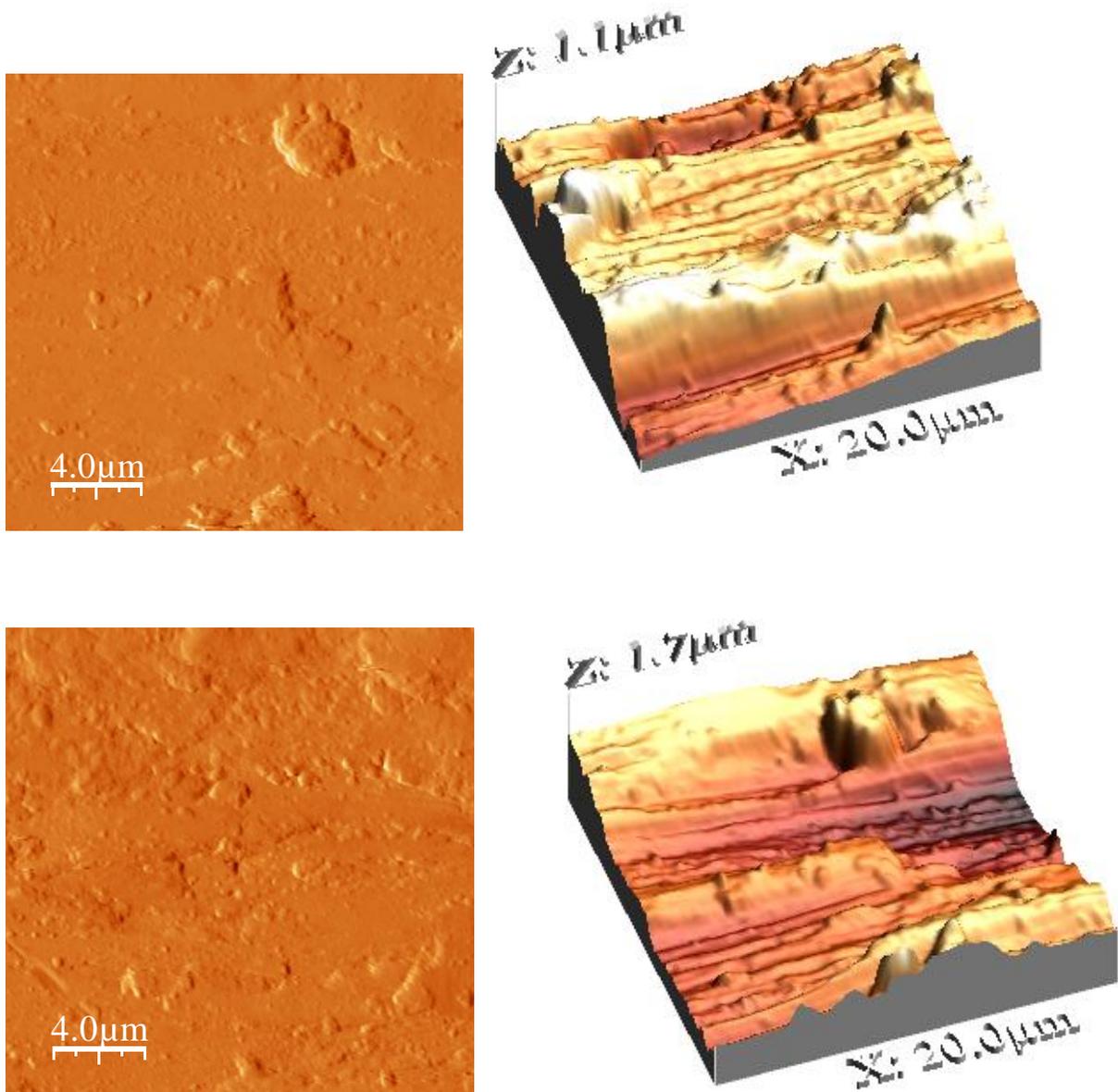


Figura 1. Imagens 2D (esquerda) e 3D (direita) de 2 campos distintos da amostra C-Ti.

A superfície A-Ti, por outro lado, apresenta vales e picos bem suaves, de altura reduzida. Não há uma orientação específica para a rugosidade desta superfície (Fig. 2 – Imagens obtidas no AFM em 2D e 3D).

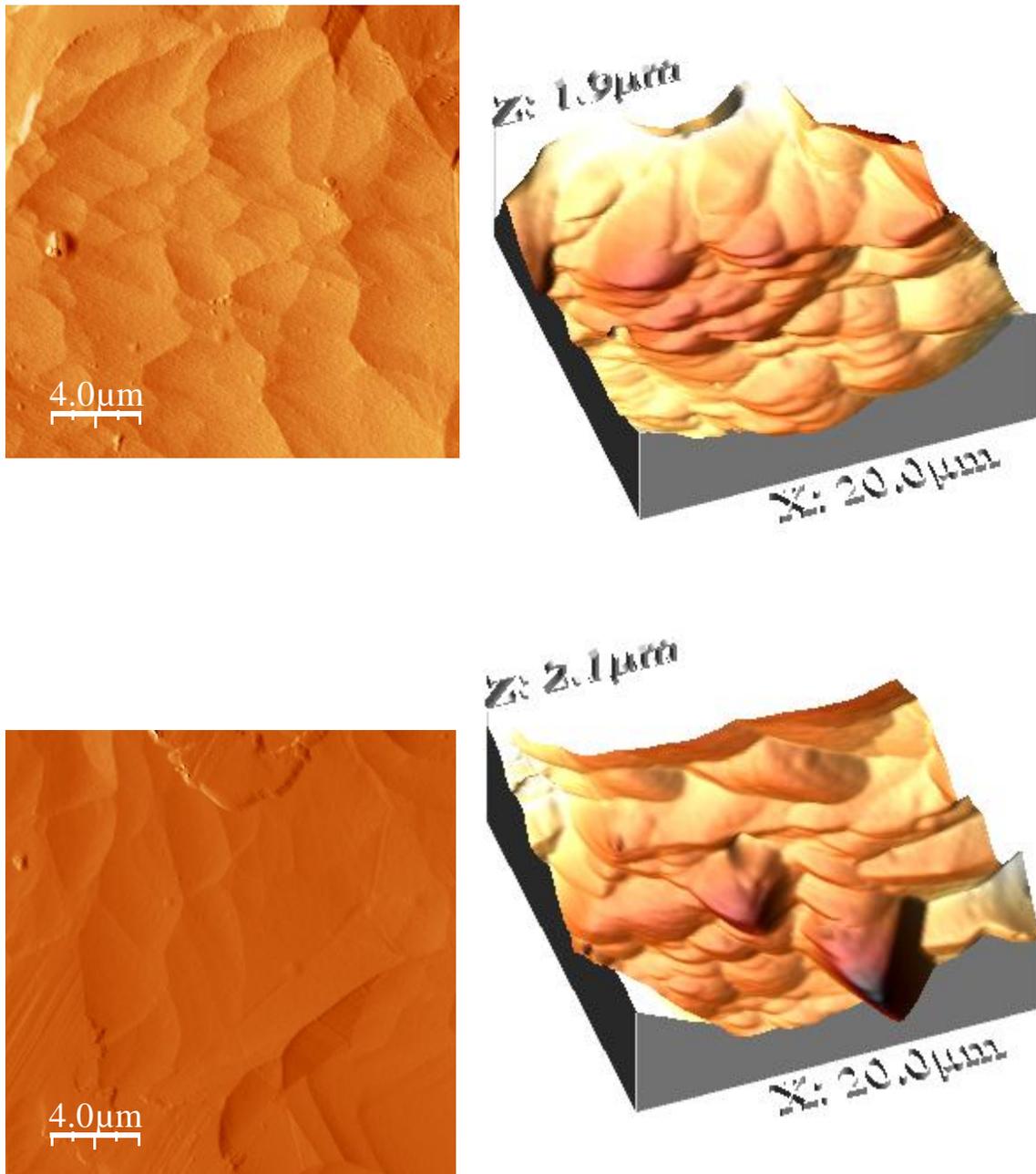


Figura 2. Imagens em 2D (esquerda) e 3D (direita) de 2 campos distintos da amostra A-Ti.

A superfície SLA apresenta características semelhantes à superfície A-Ti, principalmente a ausência de um padrão dominante de direção da rugosidade. Porém, os picos são mais altos e menos suaves do que os da superfície A-Ti (Fig. 3– Imagens obtidas no AFM em 2D e 3D)

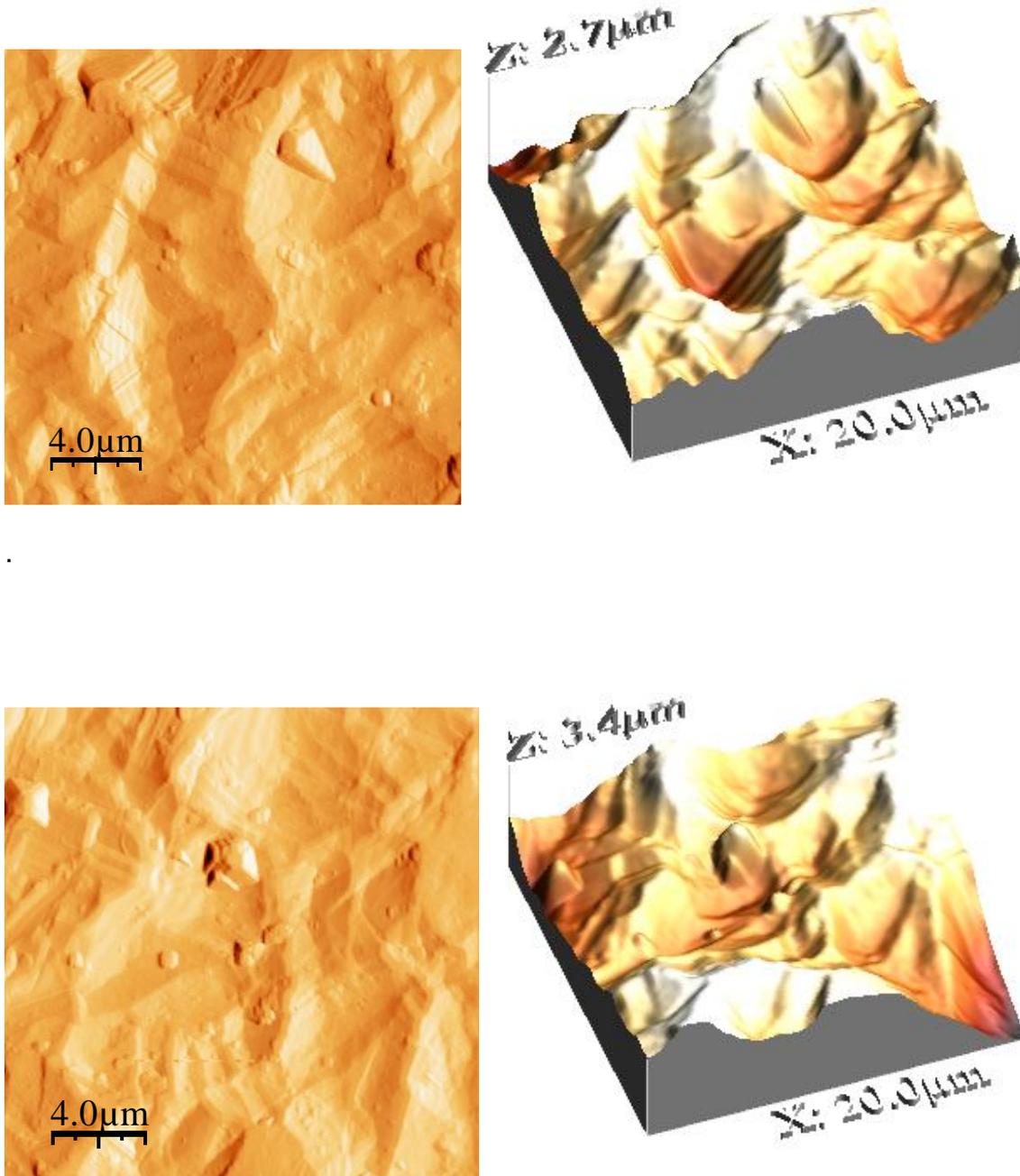


Figura 3. Imagens em 2D (esquerda) e 3D (direita) de 2 campos distintos da amostra SLA-Ti.

A Figura 4 mostra os valores dos parâmetros XTT, VN e CVDE para o HOAL depois de 4 horas em cultura. Não houve diferença estatística entre os grupos de titânio para VN (Fig. 4 B. $F=1.04$, $p=0.382$, ONE-Way ANOVA Test). Os testes XTT e CVDE mostraram diferenças estatísticas (Fig. 4 A e C. $F= 18.29$, $p= 0.000$ e $F= 5.52$, $p= 0.024$, respectivamente).

Depois de 4 horas, o A-Ti apresentou um aumento significativo sobre a atividade mitocondrial (XTT) e sobre o número de células (CVDE) quando comparado às superfícies C-Ti e SLA-Ti (A-Ti>SLA-Ti=C-Ti, Duncan Test).

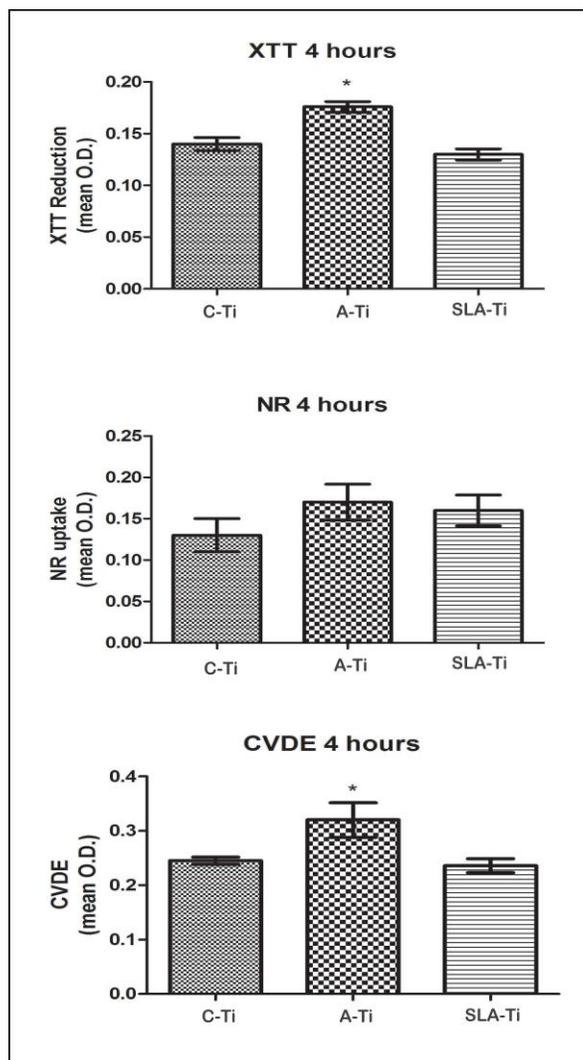


Figura 4 - Quatro horas. A- XTT, B- VN e C- CVDE

A Figura 5 mostra o comportamento do HOAL, medidas por XTT, VN e CVDE depois de 24 hs em cultura. Não houve diferença estatística entre os grupos de Ti para os parâmetros XTT e VN (Fig. 5 A e B. $F= 1.05$, $p= 0.380$ e $F= 2.62$, $p= 0.114$, respectivamente, ANOVA). Somente o teste CVDE mostrou uma diferença estatística entre os grupos (Fig. 5 C. $F= 5.92$, $p= 0.016$, ANOVA). Depois de 24 hs, não houve diferença estatística entre SLA-Ti e C-Ti, mas ambas apresentaram uma significativa redução em CVDE quando comparadas à superfície A-Ti (A-Ti>SLA-Ti=C-Ti, Duncan).

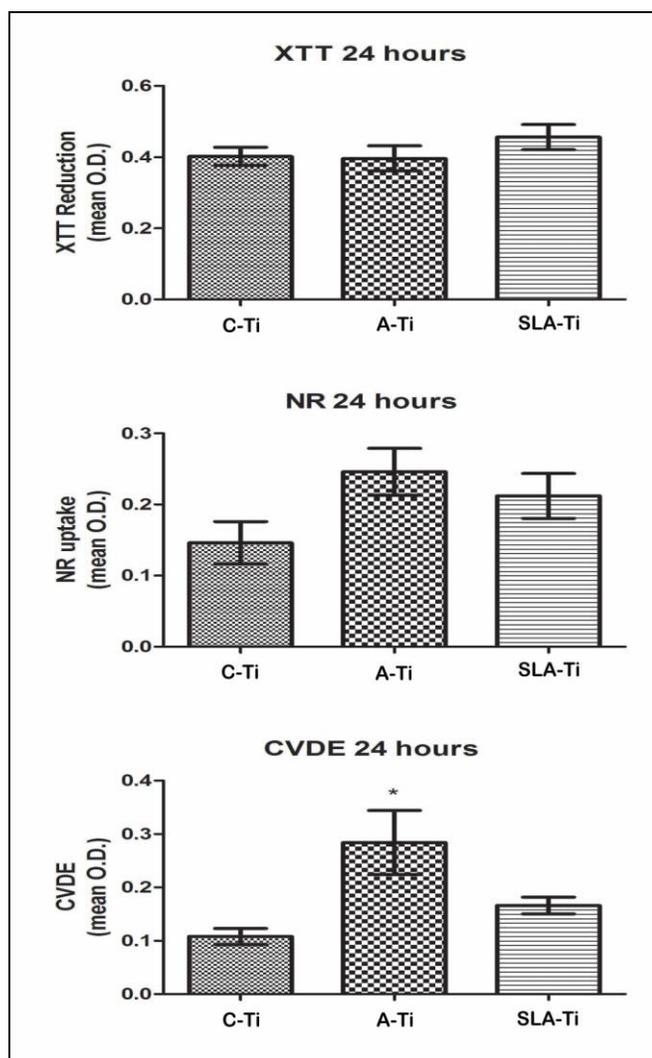


Figura 5 - 24 horas. A- XTT, B- VN, C- CVDE.

Imagens em MEV das amostras de Ti com as células

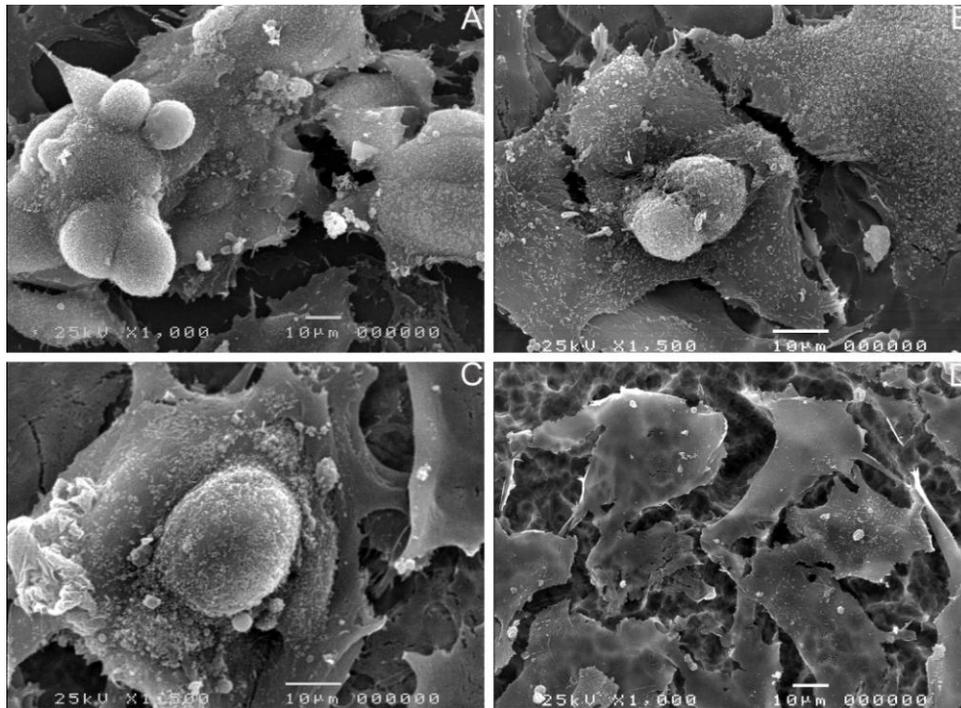


Figura 6 - Eletromicrografia de varredura. Osteoblastos humanos cultivados sobre superfícies de Ti, após 4 horas. A: Laminula (Thermanox)* – Aumento: 1.000x, B: C-Ti – Aumento: 1.500x, C: A-Ti – Aumento: 1.500x e D: SLA-Ti 4 3 – Aumento: 1.000x.

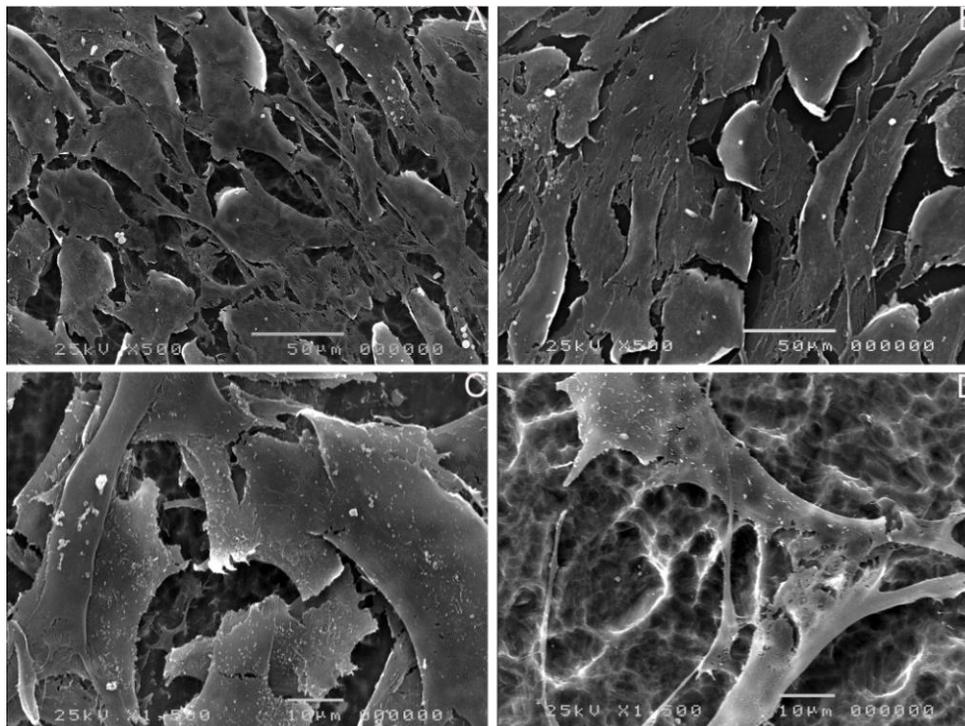


Figura 7 - Eletromicrografia de varredura. Osteoblastos humanos cultivados sobre superfícies de Ti, após 24 horas. A: Laminula (Thermanox)* – Aumento: 500x, B: C-Ti – Aumento: 500x, C: A-Ti – Aumento: 1.500x e D: SLA-Ti – Aumento: 1.500x.

De maneira geral, as células apresentaram características morfológicas normais em todas as superfícies, mostrando uma boa interação célula/Titânio, basta comparar as imagens da figura 6 (Titânio 4 horas, B, C e D) e da figura 7 (Titânio 24 horas, B,C e D), com as imagens do Thermanox* (4 horas, Figuras 6 e 7 A), que foi usado apenas para acompanhamento das condições “ideais” da cultura. As células estão homogeneamente distribuídas em todas as superfícies, em ambos os períodos (4 e 24 horas)

Na figura 6 B, pode-se observar as células aderidas à superfície C-Ti, bem espalhadas, em processo de aparente divisão celular (mitose). O mesmo acontece na superfície A-Ti (figura 6 C). Na figura 6 D (superfície SLA-Ti), as células, em aumento menor (1.000x) apresentam-se também aderidas e espalhadas, porém pode-se perceber a superfície de Ti visível entre elas, indicando que neste período de 4 horas, as células ainda não estavam em confluência.

Na figura 7 (24 horas) pode-se perceber um expressivo aumento na densidade de células em relação à figura 6 (4 horas), havendo praticamente um completo recobrimento de toda a área da lamínula (A) e de Ti (B, C e D). As células, em confluência, apresentavam-se espalhadas e interconectadas, através de prolongamentos citoplasmáticos (A, B, C e D).

5. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar as características topográficas de amostras de titânio submetidas a tratamentos distintos e estudar a viabilidade de células osteoblásticas humanas cultivadas sobre as diferentes superfícies.

Três superfícies foram avaliadas, C-Ti, A-Ti e SLA-Ti. O tratamento químico em A-Ti removeu as ranhuras paralelas produzidas pelo processo de lixamento e criou uma superfície com rugosidade baixa (Ra em torno de 0,3 μm), porém bastante homogênea. O tratamento físico-químico em SLA-Ti criou superfícies mais rugosas (Ra em torno de 0,5 μm), com picos e vales mais acentuados.

É difícil determinar precisamente quais propriedades da superfície de um implante são ideais, uma vez que existem muitos estudos com diferentes caracterizações e resultados, as discrepâncias vão do *design* do implante, rugosidade de superfície, análise em diferentes instrumentos, qualidade e quantidade óssea, técnica cirúrgica etc. (SHALABI 2006). Contudo, em 2004, Albrektson e Wennerberg (2004) obtiveram uma ótima resposta óssea a um nível de Sa (medida tridimensional da rugosidade da superfície) entre 1 e 2 μm , que eles classificaram como sendo uma superfície moderadamente rugosa (obs: superfície lisa deve ter um Sa entre 0.0-0.4 μm , superfície minimamente rugosa Sa entre 0.5 -1 μm , superfície moderadamente rugosa Sa entre 1-2 μm e superfície muito rugosa Sa > 2 μm). Parâmetros de amplitude, como Sa e Ra, são sabidamente insuficientes para descrever as características topográficas de uma superfície, portanto o Rms foi incluído para saber o quão efetiva é a área de contato da rugosidade. Vale também ressaltar que Ra é um parâmetro citado na maioria dos estudos onde descreve o valor médio da variação de altura, mas é insensível ao comprimento de onda de picos muito altos, bem como vales muito baixos (SHALABI 2006). Embora no presente trabalho tenham sido encontrados valores de rugosidade bastante próximos, entre as três superfícies testadas, as imagens do AFM mostraram características topográficas bem distintas (Figs 1,2 e 3).

Talvez essas características topográficas, mais até do que os valores de rugosidade, possam explicar o maior número de células encontrado em A-Ti, após 4 e 24h.

Por exemplo, A-Ti e SLA-Ti possuem características morfológicas iguais em todas as direções e não é possível identificar uma orientação preferencial das microcavidades, porosidades e sulcos, portanto são denominadas isotrópicas (ELIAS 2005). Essa pode ser uma das explicações para os resultados do presente estudo. Jateamento com alumina, óxido de titânio, partículas de fosfato de cálcio, plasma spray titânio, ataques químicos e oxidação anódica são tratamentos que possibilitam a formação de superfícies isotrópicas, onde é possível obter melhores reações ósseas e uma ósseointegração mais resistente.

Por outro lado, superfícies anisotrópicas são heterogêneas e apresentam marcas e sulcos orientados, que são produzidas pela usinagem, ou lixamento, como a C-Ti. (ELIAS 2005). Os implantes usinados representados pelo controle apresentaram durante muitos anos bons resultados clínicos, mas as alterações controladas da rugosidade superficial trouxeram melhores resultados em relação à força de ancoragem e travamento mecânico, principalmente nos estágios iniciais da ósseointegração (WENNERBERG 2003). Além disso, modificações na superfície são benéficas, porque aumentam o sucesso da ósseointegração pela promoção de maior área de contato osso-implante, pelo estímulo da diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos como também migração dos osteoblastos existentes (osteocondução) (SUL 2008).

O jateamento com alumina, óxido de titânio e partículas de fosfato de cálcio consiste em projetar partículas na superfície do implante através de uma cânula com ar comprimido em alta velocidade e a rugosidade será determinada pelo tamanho das partículas, que deve ser quimicamente estável, biocompatível e não causar nenhum dano a ósseointegração. A alumina deixa partículas insolúveis em sua superfície mesmo depois da lavagem em ultra-som e passivação com ácidos, estas partículas podem se desprender causando danos a tecidos sub e adjacentes, a presença do acúmulo de Al nos tecidos ósseos poderia implicar no desenvolvimento de lesões ósseas e osteomalácia.(BUSHINSKY 1995; DINIZ 2005; CANABARRO 2008).

O papel de contaminantes inorgânicos na superfície jateada por alumina relacionado às falhas nos implante, ainda não é completamente entendido (PIATTELLI 2003; DINIZ 2005; CANABARRO 2008).

Superfícies quimicamente tratadas têm sido usadas para remover os contaminantes originados do jateamento com Alumina. Nós usamos HF porque é mais efetivo comparado a outros ácidos sobre superfícies lixadas além de remover os contaminantes resultantes do jateamento (DINIZ 2005; CANABARRO 2008).

Partículas de óxido de titânio são usadas com uma granulação em torno de 25 μm , o que produz uma rugosidade moderada recomendável em torno de 1 a 2 μm (LE GUEHENNEC 2007). Implantes jateados e tratados com ácido, por exemplo, possuem superfícies com rugosidade homogênea e porosidades que permitem melhor adesão das células do que os implantes com superfícies sem tratamento (ELIAS 2005). Ainda assim, vale destacar que resultados de cultura de células variam amplamente. Parece que não existem grandes diferenças na proliferação e diferenciação sobre superfícies jateada ou tratada com ácido (BACHLE 2004). Contudo no presente trabalho esta diferença existiu em 4 e 24 hs. Observou-se em A-Ti maior número de células. Superfícies com microtextura apresentam média de rugosidade (R_a) que varia entre 0.5 a 2.0 μm , adquiridas pós-torneamento através de ataque ácido e jateamento. Estas superfícies têm influenciado positivamente na resposta do hospedeiro aos implantes endósseos com aumento significativo do contato osso-implante, comparado aos implantes lisos (MARIN 2008)

Na presente pesquisa, foram usados em um ensaio, parâmetros combinados que tem vantagens por ser simples, reproduzível, ter baixo custo, ser relevante e adequado para a avaliação de aspectos biológicos básicos relativos a biocompatibilidade. Desta maneira, três diferentes parâmetros foram avaliados na mesma amostra: (1) metabolismo mitocondrial e toxicidade respiratória, (2) integridade lisossomal e permeabilidade da membrana, (3) a presença de DNA e proliferação celular. É importante destacar que este método aumenta a chance de detecção de efeitos biológicos, permite a correlação de diferentes parâmetros e algumas vezes fornece dicas do mecanismo de toxicidade.

Por este método, foi observada pequena atividade de HOAL em XTT e CVDE com reduzido número de células sobre as superfícies C-Ti e SLA-Ti em 4

hs comparando com A-Ti. Também foi encontrado um o aumento do número de células (CVDE) sobre a superfície A-Ti que persistiu depois de 24hs.

Avaliando esses resultados, parece que algumas características topográficas, químicas e a energia de superfície presente em A-Ti desempenharam um papel importante na adesão dos osteoblastos humanos. A biocompatibilidade do material está intimamente relacionada à adesão celular (ANSELME 2000; SUL 2003). A microtopografia da superfície inicia a precoce cascata biológica de cicatrização dos implantes endósseos, através da retenção do coágulo ocasionando ativação plaquetária, que estimula a migração dos osteoblastos (DAVIES 2003). Particularmente, os osteoblastos exibem características fenotípicas rugosidade-dependente (LINKS 1998; WENNERBERG 1998). Foi mostrado que para a formação de adesão focal pelas células sobre dois ou mais picos, uma distância apropriada entre os picos deveria ser mantida, senão, a célula poderia não reconhecer esta caracterização na superfície (LINKS 1998).

O corpo celular dos osteoblastos é predominantemente observado nos vales, contudo existem prolongamentos citoplasmáticos que se direcionam aos picos (GIL 2009). Talvez, nesta superfície isotrópica homogênea, com menor número de picos e vales menos acentuados, os contatos focais se distribuem uniformemente sobre todas as membranas dos osteoblastos (HOAL) que puderam se aderir e se espriar em maior número. Se a superfície do implante possuir grandes picos e vales com superfícies lisas, as células não poderão se fixar (Elias 2009). As características em A-Ti provavelmente produzem um arcaço apropriado que otimiza a adesão inicial dos osteoblastos humanos e também parece confirmar que HOAL é mais sensível à organização e morfologia da rugosidade do que à amplitude (ANSELME 2005). Assim, podemos concluir que a direcionalidade dos sulcos, aliada a baixa rugosidade, em C-Ti, levou a diminuição da adesão dos osteoblastos. Por outro lado, o aumento da rugosidade na superfície jateada, porém com picos e vales mais acentuados, também não favoreceu a adesão celular na análise de 4 e 24 hs.

Estudos recentes revelaram que osteoblastos espriaram mais nas superfícies com baixa amplitude de rugosidade (com vales mais rasos). No entanto, diferente do presente trabalho, outros estudos mostram uma alta força de

adesão nas superfícies mais rugosas (ANSELME & BIGERELLE 2005, NISHIMOTO, 2008).

Brett et al (2004) caracterizaram 3 superfícies: lisa (SMO), SLA e TPS e os resultados mostraram que depois de 3 horas, as células em SLA estavam notavelmente menos espalhadas e mais arredondadas comparadas a SMO e TPS e acrescentaram que as células sobre a superfície TPS não somente estavam bem aderidas, como também mostraram um aumento no número de células, que foi significativamente elevado comparado a SMO.

A biocompatibilidade de um material está estreitamente relacionada com a resposta fisiológica da célula em contato com a sua superfície. Os fenômenos de interação entre células e substratos podem ser definidos de forma bastante abrangente, como mecanismos pelos quais as células são capazes de responder a estímulos do meio ambiente externo e como estes influenciam sua adesão, proliferação e diferenciação (ANSELME 2000). A configuração em micro escala imposta pelos tratamentos com ácidos às superfícies de implantes, como no presente trabalho, parece induzir uma elevação na retenção de fibrina aumentando o recrutamento de células osteogênicas, diferenciação e condução fornecendo um caminho para a superfície do implante, onde ocorre o espraiamento através de prolongamentos citoplasmáticos e formação de matriz orgânica (ELIAS 2001; WAEL, 2007). Em sua pesquisa, Fernandes (2007) concluiu que a textura da superfície é mais importante que a estabilidade primária. Ele testou implantes com ataque ácido e usinados com alta e baixa estabilidade primária, e os resultados mostraram que os implantes com ataque ácido obtiveram melhores resultados no contato osso-implante e também nos testes de remoção.

Klokkevold *et al* em 1997 estudaram o aumento da força de ósseointegração em superfícies com ataque ácido comparadas às maquinadas, através da análise do torque reverso e concluíram que os implantes com ataque ácido obtiveram um aumento do torque reverso quatro x maior que os usinados, 2 meses após a instalação.

Em 1998 D'Lima et al analisaram 3 superfícies de implantes em coelhos, que foram: texturizadas em forma de malha, jateadas com areia e com ataque ácido com rugosidades médias de 400 μm , 18 μm e 6 μm , respectivamente,

medidas com microscópio de varredura. As análises foram feitas com 2,6 e 12 semanas e encontraram maior média de ósseointegração nas superfícies com ataque ácido.

Em 2000 Cordioli *et al* fizeram um estudo das análises do torque de remoção e histomorfometria óssea em 4 superfícies de implante: usinada, jateada, com ataque ácido e plasma spray titânio. O resultado mostrou aumento do torque reverso no grupo do ataque ácido e o menor no usinado.

Sendo assim, podemos concluir que algumas características da superfície com tratamento ácido (A-Ti), como valores moderados de amplitude de rugosidade, picos e vales homogêneos e em baixa escala, distribuídos de maneira uniforme e sem uma direção predominante, aumentaram o número de células aderidas após 4 e 24h e a atividade mitocondrial após 4h. Como a adesão é considerada um dos eventos iniciais mais críticos na interação entre as células e a superfície dos implantes, e tem uma grande influência na proliferação e diferenciação de células ósseas antes da formação do tecido calcificado (ANSELME 2000), pode ser interessante a utilização clínica de implantes de Ti com características topográficas semelhantes a A-Ti.

6. CONCLUSÃO

Avaliando estes resultados, parece que algumas características topográficas, químicas e de energia de superfície, presentes em A-Ti, desempenham um papel importante na adesão de HOAL em 4 e 24 hs.

A direcionalidade dos sulcos, aliada a baixa rugosidade em C-Ti, bem como o aumento dos picos e vales na superfície jateada SLA-Ti, não favoreceu a adesão celular.

A adesão é considerada um evento inicial crítico, porque influencia na proliferação e diferenciação de células ósseas, antes da formação de tecido calcificado, portanto pode ser interessante a utilização de implantes com caracterização topográfica de A-Ti.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBREKTSON, T.; WENNERBERG, A. "Oral implant surface: part 1-review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them", *Int j of Prosthodontics* 2004;17:536-543.

ANSELME, K. "Osteoblast adhesion on biomaterials" **Biomaterials**, 2000;21:667-681.

ANSELME K., BIGERELLE, M. "Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion". **Acta Biomaterialia**2005;1:211-222.

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

BRETT, P.M.; HARLE, J.,; SALIH, V.; MIHOC, R.; OLSEN, I.; JONES, F.H.; TONETTI, M. "Roughness response genes in osteoblasts". **Bone** 2004;35:124-133.

BUSHINSKY, D.A.; SPRAGUE, S.M.; HALLEGOT, P.; GIROD, C.; CHABALA, J.M.; LEVI-SETTI, R. "Effects of aluminum on bone surface ion composition. **J Bone Miner Res** 1995;10:1988-1997.

CANABARRO, A.; DINIZ, M.G.; PACIORNIK, S.; CARVALHO, L.; SAMPAIO, E.M.; BELOTI, M.M.; ROSA, A.L.; FISCHER RG." High concentration of residual aluminum oxide on surface inhibits extracellular matrix mineralization". **J Biomed Mater Res**, 2008;87A:588-597.

CORDIOLI, G.; MAJZOUN, Z.; PIATTELLI, A.; SCARANO, A." A Removal Torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surface: an experimental study in rabbit tibia". **Int. J. Maxillofac. Implants** 2000;15:668-74.

DAVIES, J.E. ."Understanding peri-implant endosseous healing".**Journal of Dental Education** 2003;67(8):932-947.

DINIZ, M. G.; PINHEIRO, M. A. S.; ANDRADE Jr., A. C. C.; FISCHER, R. G. Characterization of titanium surfaces for dental implants with inorganic contaminant. **Braz. Oral Res.** 2005 ;19:106-111.

D'LIMA, D. D.; LEMPERLE, S. M.; HOLMES, R. E. *et al* "Bone response to implant surface morphology". **J Arthroplasty**,1998; 13(8):928-934.

ELIAS, C. N., LIMA, J. H. C. Importância da qualidade da superfície dos implantes ósseo-integráveis na biofixação. **Rev. Bras. Implant.**2001;7(1):21-25.

ELIAS, C. N.; LIMA, J. H. C.; FILHO, F. C. S.; MULLER, C. A. "Interações de células com diferentes superfícies de implantes dentários". **RBO**, 2005;62(1e2): 119-124.

ELIAS, C. N.; LIMA, J.H.C.; MEIRELLES, L.A. "**Varição da osseointegração com a rugosidade dos implantes odontológicos**" www.materia.coppe.ufrj.br/sarra/artigos/artigo_10097/index.html 2009.

FERNANDES E. L., UNIKOWSKI I. L., TEIXEIRA E.R., COSTA N.P., SHINKAI R.S., "Primary Stability of turned and acid-etched screw-type: A removal torque and histomorphometric study in rabbits" **Int. J. Maxillofac. Implants** 2007;22:886-892.

GIL, L.M.; LADEIRA, T.C.; MENEZES, G.C.; SILVA FILHO, F.C. "A interface célula-matriz extracelular-biomaterial e a biocompatibilidade de implantes de titânio". **Innovation Implant J, Biomater Esthet**, São Paulo, 2009;4(3):58-64.

KLOKKEVOLD, P.R.; NISHIMURA, R.D.; ADACHI, M.; CAPUTO, A. "Osseointegration enhanced by chemical etching of titanium surface". **Clin Oral Implants Res**. 1997;8:442-7.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Anal Biochem** 1989;182:16-9.

LE GUEHENNEC, L *et al.* "Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration". **Dental Materials** 2007;23:844-854.

LINCKS J.; BOYAN B. D.; BLANCHARD C. R.; LOHMANN C. H.; LIU Y.; COCHRAN D.L.; DEAN D. D, SCHWARTZ Z., "Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. **Biomaterials**, 1998;19: 2219-2232.

MARIN, C.; GRANATO, R., SUZUKI M.; GIL J.N.; PIATTELLI, A.; COELHO, P., "Removal Torque and Histomorphometric evaluation of bioceramic grit-blasted/acid-etched and dual acid-etched implant surfaces: an experimental study in dogs". **J Periodontol**.2008;79:1942-1949.

NISHIMOTO, S.K. *et al* "The effect of Titanium surface roughening on protein absorption, cell attachment, and cell spreading" **Int. J. Maxillofac. Implants** 2008; 23:675-680.

PIATELLI, A.; DEGIDI, M.; PAOLANTONIO, M.; MANGANO, C.; SCARANO, A. "Residual aluminium oxide on the surface of titanium implants has no effect on osseointegration". **Biomaterials** 2003; 24:4081-4089.

SCUDIERO, D.A.; SHOEMAKER, R.H.; PAULL, K.D.; *et al.* Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. **Cancer Res** 1988;48:4827-33.

SHALABI, M.M.; GORTEMAKER, A.; VAN HOF, M.A.; JANSEN, J.A.; CREUGERS, N.H.J. "Implant Surface roughness and bone healing: a systematic review". **J Dent Res** 2006;85(6):496-500.

SUL, Y. T. The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: Special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant. **Biomaterials**, 2003;24: 3893-3907.

WAEEL *et al* "Effect of supramicron roughness characteristics produced by 1 and 2 step acid etching on osseointegration capability of titanium". **Int. J. Maxillofac. Implants** 2007;22:719-728.

WENNERBERG, A.; HALLGREN, C.; JOHANSSON, C.; DANELLI, S. "A histomorphometric evaluation of screw –shaped implants each prepared with two surface roughnesses". **Clin Oral Impl Res** 1998;9:11-19.

WENNERBERG, A; ALBREKTSSON. T "Bone response to surface roughness:Measurements and results from experimental and clinical studies", in **Bio-Implant Interface**, Improving Biomaterials and Tissue Reaction, CRC Press (ed.) Boca Raton (2003).

WINCKLER, J. [Vital staining of lysosomes and other cell organelles of the rat with neutral red (author's transl)]. **Prog Histochem Cytochem** 1974;6:1–91.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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