FABIANA FERREIRA ALVES

**Estudo comparativo da interação celular entre quatro tipos de
implantes dentários**

São Paulo

2014

FABIANA FERREIRA ALVES

**Estudo comparativo da interação celular entre quatro tipos de
implantes dentários
Versão corrigida**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências Odontológicas

Área de Concentração: Cirurgia e
Traumatologia Bucomaxilofaciais

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria da Graça
Naclério-Homem

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Alves, Fabiana Ferreira.

Estudo comparativo da interação celular entre quatros tipos de implantes dentários / Fabiana Ferreira Alves; orientadora Maria da Graça Naclério-Homem. -- São Paulo, 2014.

95 p. : il. : fig. , tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Implantes Dentários. 2. Osseointegração. 3. Osteoblasto. 4. Células do Osso Alveolar. 5. Titânio - Odontologia. I. Naclério-Homem, Maria da Graça. II. Título.

ALVES FF. Estudo comparativo da interação celular entre quatro tipos de implantes dentários. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a) _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a) _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a) _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico a **Deus**, por ter me conduzido até aqui.

Aos meus pais, **Orivaldo Maurício Alves** e **Maria José Ferreira Alves**, por fazerem da minha vida uma história que está dando certo.

Ao meu filho **Guilherme Mauricio** ,por me fazer completa, apenas por existir.

A minha avó, **Maria Abadia**, por ser a protagonista do “Deus te abençoe!” mais doce.

Com muito amor e gratidão!

Fabiana Ferreira Alves

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Naclério-Homem, pois desde a primeira ocasião sempre me deu oportunidade para crescer pessoalmente e profissionalmente.

À Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Zindel Deboni pela amizade e por todo incentivo na minha qualificação profissional.

À Dr.^a Vera Regina Pozanni por toda serenidade e tranquilidade no ensino do atendimento ao paciente com necessidade especial.

À Prof.^a Dr.^a Márcia Martins Marques pela oportunidade de trabalhar com cultura de célula, pelo carinho e pela brilhante supervisão na execução desta dissertação.

À minha amiga, Mariana Aparecida Brozoski, pela paciência, dedicação e critério em todo auxílio no meu treinamento em cultura de célula.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Arana e Prof. Dr. Nilton Azambuja Junior pelo aprendizado e por terem possibilitado ilustrar o meu trabalho com Eletronmicrografias de excelência e pela certeza de que ganhei verdadeiros amigos.

Ao Prof. Dr. Fausto Medeiros Mendes pelo auxílio, de forma ímpar, na execução da estatística deste trabalho.

Aos meus amigos Angélica Castro Pimentel e Marcello Roberto Manzi por todo apoio dado e pelos contatos com as empresas que foram decisivos no momento da doação dos implantes dentários para a pesquisa.

Aos meus amigos pós-graduandos e estagiários, pelo auxílio em pequenas e grandes dificuldades, pela companhia e pela grande experiência vivida.

A todos os funcionários pelo acolhimento fraterno que sempre me deram.

À Universidade de São Paulo.

Minha eterna gratidão!

“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.” (*Marie Curie*)

RESUMO

Alves FF. Estudo comparativo da interação celular entre quatro tipos de implantes dentários [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, 2014. Versão corrigida.

O tratamento de superfície dos implantes dentários é um critério importante para a osseointegração. Considerando a variedade de modificações das superfícies encontradas, estas podem acelerar ou melhorar o processo de osseointegração. Para tanto foram estudadas as características da composição química e a rugosidade, a partir das quais foram encontradas diferentes respostas celulares em estudos comparativos *in vitro*. O objetivo deste estudo foi comparar a adesão e o crescimento dos OSTEON-1 em implantes dentários com diferentes tratamentos de superfície. Foram utilizados quatro tipos de implantes dentários comercialmente disponíveis, com os seguintes tratamentos de superfície: (A) jateamento e condicionamento ácido com revestimento de fosfato e cálcio (CaP); (B) duplo condicionamento ácido; (C) condicionamento ácido; (D) oxidação anódica. Os implantes de mesmo tamanho foram fixados com dispositivo biocompatível no fundo dos poços das placas de cultura de 12 poços e cobertas com meio de cultura de células. Os OSTEON-1 foram colocados no corpo do implante. Nos períodos de 24, 48 e 72 horas mais tarde, as culturas foram submetidas ao ensaio de redução de MTT para avaliar a viabilidade celular. Os dados foram utilizados para analisar a adesão celular (24h) e para obter as curvas de crescimento das células (24, 48 e 72h). Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram comparados por ANOVA, complementado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os OSTEON-1 aderiram ao corpo de todos os tipos de implantes testados. A maior taxa de crescimento celular foi observada em culturas semeadas sobre tratamento de superfície A. O menor crescimento celular foi apresentado por culturas semeadas no tratamento de superfície D ($p < 0,05$). Com base nesta investigação *in vitro* é possível concluir que todos os implantes dentários testados, independentemente do tratamento de superfície, não são citotóxicos para os OSTEON-1. No entanto, as características físico-químicas do tipo de tratamento de superfície dos implantes dentários influencia o crescimento celular. A superfície A pareceu ter o comportamento mais compatível com os OSTEON-1, uma vez que promoveu mais crescimento celular.

Palavras-chave: Implantes Dentários. Osseointegração. Osteoblastos. Propriedades de Superfície. Titânio.

ABSTRACT

Alves FF. Comparative study of cellular interactions between four types of dental implants [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão corrigida.

The surface treatment of dental implants is a major feature for osseointegration. The variety of surface modifications found may be speed up or enhance the osseointegration process. In much was studied the chemical composition and characteristics of roughness, from which found different cellular responses in comparative studies *in vitro*. The aim of this study was to compare the adhesion and growth of osteoblast-like cells in response to dental implants characterized by different superficial treatments. Four types of dental implants with different superficial treatments were used. The commercially available implants presented the following superficial characteristics: (A) sandblasted with acid-etched and calcium phosphates (CaP) coating; (B) double acid-etched; (C) anodized, or (D) acid-etched. The implants of the same size (n= 3 per group/experimental time) were fixed with a biocompatible device on the bottom of the wells of 12 wells cell culture plates and covered with cell culture medium. Osteoblast-like cells (Osteo 1 cell line) were plated on the top of the implants (5×10^4 cells/implant). Twenty-four, 48 and 72 hours later, the cultures were submitted to the MTT reduction assay to assess cell viabilities. Data was used for analyze cell adhesion (24 h) and to obtain cell growth curves (24, 48 and 72 h). The experiments were done in triplicate. Data were compared by ANOVA complemented by the Tukey's test ($p < 0.05$). Osteoblast-like cells adhered on the top of all types of implants tested. The highest cell growth was observed in cultures plated on the top of sandblasted with acid-etched and CaP coating surfaces. The smallest cell growth was presented by cultures plated on double acid-etched surfaces ($p < 0.05$). Based on this *in vitro* investigation, it is possible to conclude that all dental implants tested irrespective to the surface treatment, are non-cytotoxic for osteoblast-like cells. However, the physicochemical characteristics of the type of dental implants surface treatment influences the cell growth. In fact, the surface treated by sandblasting with acid-etched and CaP coating seemed to the most compatible with osteoblast-like cell biology, once it promoted the highest cell growth.

Keywords: Dental Implants. Osseointegration. Osteoblasts. Surface Properties. Titanium.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Confeção do dispositivo de acrílico. Canaleta (A). Cortadas em Labcut 1010 - Exttec® (B). Espessura padronizada de 0,7cm por paquímetro manual – ICE (C).....52
- Figura 4.2 - Eletronmicrografia de células OSTEO-1 crescidas no fundo da placa de cultivo ao redor do dispositivo acrílico. Observe a ausência de halo de inibição do crescimento celular em microscópio invertido de fase (Nikon TMS, Nikon, Melville, NY, EUA)53
- Figura 4.3 - Pinça de titânio- Neodent®53
- Figura 4.4 - Colocação do implante no interior do dispositivo acrílico. O implante retirado da embalagem original, utilizando a chave curta de instalação para contra-ângulo do sistema (A). O dispositivo aberto com a pinça de titânio Neodent® (B). O implante sendo posicionado no interior do dispositivo (C). Posicionado no interior dispositivo acrílico (D)54
- Figura 4.5 - Os implantes posicionados na placa. Os implantes no interior do dispositivo colocado em placas de poliestireno de 12 poços contendo 100 mL de DMEM com 15% SFB (A). As células plaqueadas sobre os respectivos implantes numa densidade celular de 5×10^4 células / poço (B). Os quatro implantes com as células plaqueadas submetidos ao cultivo (C).....54
- Figura 4.6 - Reagente A (0,05g de pó de MTT dissolvido em 10mL de PBS). Após o período de cultivo o conjunto implante (A). Dispositivo acrílico foi transferido ao poço ao lado contendo adicionado 200µl da solução de MTT e 1800µl de DMEM com 15% SFB (B).....56
- Figura 4.7 - Reagente B (DMSO e tampão glicina 1:4). O formazan, de cor azul purpúrea, solubilizado sobre o conjunto dispositivo (A). Implante removido após 20 minutos (B).....57

Figura 5.1 - Eletronmicrografia da caracterização qualitativa dos quatro implantes testados. Jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP (A). Duplo condicionamento ácido (B). Condicionamento ácido (C). Oxidação Anódica (D). Aumento original de 10x (1), Aumento original de 300x (2)	60
Figura 5.2 - Eletronmicrografia da adesão celular em 24 horas nos quatro implantes testados. Jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP (A). Duplo condicionamento ácido (B). Condicionamento ácido (C). Oxidação Anódica (D). Aumento original de 100x (1), Aumento original de 300x (2)	62
Figura 5.3 - Eletronmicrografia da adesão celular em 24 horas nos quatro implantes testados. Jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP (A). Duplo condicionamento ácido (B). Condicionamento ácido (C). Oxidação Anódica (D). Aumento original de 500x (1), Aumento original de 1000x (2)	63
Figura 5.4 - Eletronmicrografia da mitose celular na superfície com jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP (24h). (Aumento original de 2000x)	64
Figura 5.5 - Eletronmicrografia da adesão celular em 72 horas nos quatro implantes testados. Jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP (A). Duplo condicionamento ácido (B). Condicionamento ácido (C). Oxidação Anódica (D). Aumento original de 100x (1), Aumento original de 300x (2)	65
Figura 5.6 - Eletronmicrografia da adesão celular em 72 horas nos quatro implantes testados. Jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP (A). Duplo condicionamento ácido (B). Condicionamento ácido (C). Oxidação Anódica (D). Aumento original de 500x (1), Aumento original de 1000x (2)	66

Figura 5.7 – Eletronmicrografia de células OSTEO-1 crescidas no fundo da placa de cultivo ao redor dos implantes. Observe a ausência de halo de inibição do crescimento celular em microscópio invertido de fase no cultivo de 24, 48 e 72 h. Jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP (A). Duplo condicionamento ácido (B). Condicionamento ácido (C). Oxidação Anódica (D). Monitorado em 24 (1), 48 (2) e 72 (3) horas de cultivo (Aumento original 10x) 68

Figura 5.8 – Gráfico da diferença significativa dos dados da densidade óptica da interação das células OSTEO-1 com as diferentes características físico-químicas dos tratamentos de superfícies dos quatro implantes dentários em relação à viabilidade celular, adesão (24h) e crescimento celular (48 e 72h)..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Descrição dos implantes utilizados no estudo (marca, nome da superfície no experimento e no tratamento, descrição do implante, largura (mm), comprimento (mm), identificação no catálogo	49
Tabela 4.2- Descrição nos trabalhos anteriores das rugosidades dos tratamentos de superfície estudados. (Estudos, protótipo de estudo, nome da superfície comercialmente disponível, equipamento utilizado para caracterização e resultados Sa, Sds, Sdr).....	50
Quadro 4.1- Modelo do posicionamento dos implantes em 01 placa de 12 poços ...	57
Tabela 4.3- Quantidade de implantes utilizados no modelo experimental para comparar a influência dos tratamentos de superfície no processo de interação das células ósseas	58

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grau Celsius
µl	microlitro
µm	micrômetro
Al ₂ O ₃	óxido de alumínio (alumina)
ALP	fosfatase alcalina
ASTM	American Society for testing and Materials
BIC	Bone Implant Contact (contato osso-implante)
BMP	proteína óssea morfogenética
CaP	cálcio e fosfato
cm ²	centímetro quadrado
EDS	espectroscopia de energia dispersa
EDTA	etilediaminotetracético
Er: YAG	ítrio alumínio dopado em érbio
g	grama
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
HA	adição de hidroxiapatita
HCl	ácido clorídrico
HF	ácido fluorídrico
HMDS	hexametildisilane
HNO ₃	ácido nítrico
HOO	peróxido de hidrogênio
Krf	Fluoreto de krypton
LELO	Laboratório Especial de Laser em Odontologia
MEC	Matriz Extracelular
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
Mg	magnésio
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MTT	teste de brometo 3 – [4,5-dimetil-tiazol–2-il]–2,5–difetil-tetrazólio]

N	Newton
NaCl	cloreto de sódio
Nd:YAG	ítrio-alumínio dopado com neodímio
nm	nanômetro
OPG	osteoprotegerina
Ra	média aritmética do perfil
RGD	ácido arginina-glicina-aspartico
Sa	média aritmética da superfície
SDr	média aritmética hídrica
SDs	média aritmética da densidade
SFB	Soro fetal Bovino
SIN	Superfície Ativada
SLA	sandblasted, large grit, acid etching
TGF- β 1	fator de crescimento- β 1
Ti ₆ Al ₄ V	liga metálica de alumínio e vanádio
TiO ₂	óxido de titânio
TiZr	liga de titânio-zircônio
TNF- α	fator de necrose tumoral- α
TPS	Spray de Plasma Titânio
UVA	ultravioleta A
UVC	ultravioleta C

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISTA DE LITERATURA	24
2.1 Histórico da implantodontia	24
2.2 Tratamento de superfícies dos implantes dentários	26
2.2.1 Superfícies usinadas	26
2.2.2 Superfícies modificadas por adição	27
2.2.3 Superfícies modificadas por subtração	28
2.3 Osseointegração	31
2.3.1 Conceito	31
2.3.2 Requisitos para a osteointegração	32
2.3.3 Processo de reparo	34
2.4 A influência do tratamento de superfície do implante na osseointegração	35
2.4.1 Características dos tratamentos de superfície dos implantes	36
2.4.2 Modificação da rugosidade	36
2.4.3 Modificação química e de energia da superfície	37
2.4.4 Caracterização do tratamento de superfície	38
2.4.5 Mecanismo de interação das células com a superfície dos implantes	39
2.5 Formas de avaliação	40
2.5.1 Metodologia dos estudos <i>in vitro</i> de tratamento de superfície em modelo de osteointegração	41
2.6 Estudos comparativos do tratamento de superfície comercialmente disponível	43
2.6.1 Estudos <i>in vivo</i> comparativos do tratamento de superfície comercialmente disponível	43
2.6.2 Estudos <i>in vitro</i> comparativos do tratamento de superfície comercialmente disponível	44
2.6.3 Estudos comparativos dos tratamentos de superfícies dos implantes fabricados no Brasil	45
3 PROPOSIÇÃO	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Implantes	48

4.2 Caracterização dos tratamentos de superfícies dos implantes.....	49
4.2.1 Caracterização quantitativa do tratamento de superfície	49
4.2.2 Caracterização qualitativa do tratamento de superfície	50
4.3 Cultivo celular	51
4.3.1 Cultura de células nos implantes.....	52
4.3.2 Adesão celular	55
4.3.3 Viabilidade celular e curva de crescimento.....	56
4.4 Análise estatística	58
5 RESULTADOS	59
5.1 Caracterização qualitativa dos tratamentos de superfície	59
5.2 Avaliação qualitativa da adesão, viabilidade e crescimento celular	61
5.2.1 Adesão celular	61
5.2.2 Viabilidade celular	67
5.3 Avaliação quantitativa de adesão, viabilidade e crescimento celular	69
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	82
ANEXO	95

1 INTRODUÇÃO

A reconstrução dos maxilares representa uma das tarefas mais árduas para o cirurgião bucomaxilofacial. As demandas para a reconstrução da maxila e da mandíbula representam desafios, pois os requisitos para o sucesso seguem critério restrito para a oclusão da dentição e da reabilitação oral (Bianchi et al., 2013).

A revolução na reabilitação oral da reconstrução maxilomandibular ocorreu após Branemark, em 1969, descobrir a osseointegração, definida por ele como conexão direta estrutural e funcional entre o tecido ósseo vivo e a superfície de um implante submetido à carga funcional (Albrektsson et al., 1981). A ausência dental, por diversas causas, como: cárie, doença periodontal avançada, trauma, lesões ósseas, genética, passou a ser solucionada com alto índice de sucesso, o que melhorou a qualidade de vida dos pacientes (Mendonça et al., 2008).

Um dos objetivos da implantologia atual tem sido desenvolver superfícies de titânio que acelerem e aumentem a osteogênese adjacente aos implantes. Desde o início da década de 1980, o tratamento de superfície foi identificado como um dos seis requisitos importantes para a incorporação do implante ao osso. Estratégias para alcançar esse efeito incluem as modificações das características da superfície, ou seja, rugosidade, composição química e energia, que podem afetar as funções celulares na interface osso-implante (Albrektsson; Wennerberg, 2004). Com isso, pode ser indicado especialmente para casos em que há comprometimento do metabolismo ósseo local ou sistêmico, por exemplo, na presença do osso tipo IV de acordo e em paciente com diabetes *mellitus* (Wennerberg; Albrektsson, 2010).

Como resultado, nos últimos 20 anos, número significativo de sistemas de implantes, com diferentes tratamentos de superfície, foi introduzido no mercado, tanto por processos subtrativos, como aditivos e associação. Neles, incluem-se: jateamento, condicionamento ácido, anodização e revestimento de fosfato de cálcio (Le Quehennec et al., 2007; Yeo et al., 2008; Schliephake et al., 2009). Todos esses tipos de tratamentos de superfície procuram alterar as características físicoquímicas da superfície usinada e elevam-nas em níveis considerados ideais.

A avaliação da resposta do tecido ósseo em relação às modificações das superfícies, pode ser realizada por diversos tipos de estudos científicos, pela avaliação clínica, estudos *in vivo* e *in vitro* (Wennerberg; Albrektsson, 2009). Os

estudos *in vitro* são amplamente utilizados para a avaliação da interação das células ósseas com os diferentes tratamentos de superfície e estão relacionados aos tipos de estudo de mais praticidade, porém de baixo potencial para estabelecer evidências diretamente aplicáveis à prática clínica (Forrest; Miller, 2001). Além disso, a maioria dos estudos *in vitro* acerca da interação celular utiliza um disco de titânio como protótipo para realização das análises, o que não representa totalmente a situação clínica, que seria mais bem caracterizada pelo formato de parafuso do implante (Zambuzzi et al., 2014).

Com isso são estudadas as características da composição química e a rugosidade da superfície, a partir das quais encontraram diferentes respostas celulares, em estudos comparativos *in vivo* e *in vitro* (Anselme et al., 2010; Wennerberg; Albrektsson, 2010). No entanto, poucos estudos avaliaram as superfícies disponíveis comercialmente, enquanto a maioria utilizou superfícies experimentais (Liu et al., 2013).

Até o momento, nos estudos clínicos e *in vivo*, as certezas foram limitadas aos resultados do maior torque de remoção; já os que tratam do contato osso-implante foram influenciados por implantes com tratamento de superfície que apresentaram alteração da rugosidade na escala micrométrica (Wennerberg; Albrektsson, 2009). Ainda, algumas indicações sugerem que essas respostas ósseas são influenciadas pela alteração da superfície em nível nanométrico (Wennerberg; Albrektsson, 2010).

Superfícies com alteração da rugosidade em nível nanométrico são caracterizadas por apresentar estruturas com dimensões de 1-100 nm. Atualmente o interesse pela nanotecnologia aumentou, visto que as pesquisas sugerem ser esta um dos fatores decisivos para a osseointegração mais rápida (Rosei, 2004). A nanotopografia pode ser realizada por adição na superfície de cálcio e fósforo ou outros substratos, no entanto a importância da nanotecnologia e da composição química da superfície dos implantes na interação celular deve ser determinada (Zambuzzi et al., 2014).

O Brasil é atualmente um dos maiores mercados de implantes dentários no mundo. Dado apresentarem custo mais acessível em relação aos importados, os implantes nacionais podem se tornar muito competitivos no mercado mundial. Porém, poucos estudos comparativos foram encontrados sobre a interação celular

com as características físico-químicas das superfícies dos implantes nacionais (Rosa et al., 2013).

Neste estudo, avaliamos *in vitro* a influência dos diferentes tratamentos de superfície dos implantes dentários comercialmente disponíveis no Brasil: jateamento e condicionamento ácido com revestimento de cálcio e fosfato; duplo condicionamento ácido; condicionamento ácido e oxidação anódica em modelo de osseointegração, utilizando dispositivo biocompatível para a fixação do implante dentário.

2 REVISTA DE LITERATURA

2.1 Histórico da implantodontia

O edentulismo, ou ausência de dentes, tem sido uma preocupação desde o Egito antigo, posto que se encontram registros nas escrituras de dentes de animal em marfim, esculpidos e implantados, como os mais antigos espécimes da implantodologia primitiva (Abraham, 2014).

No século XVII, iniciaram-se as pesquisas com os transplantes dentários entre indivíduos da mesma espécie; na Inglaterra e na América colonial, os indivíduos pobres extraíam seus dentes e vendiam para serem transplantados em pacientes ricos. As pesquisas com transplante dental continuaram por anos, e o acompanhamento clínico desses dentes resultou em anquilose e a reabsorção radicular de modo que não foi considerada como solução ideal para o edentulismo (Schwartz; Andreasen, 1988).

Em 1809, Maggiolo (apud Abraham, 2014) instalou um implante de ouro com prolongamento coronário e de único estágio. As complicações pós-operatórias incluíram: dor, inflamação e perda do implante. A partir dessa tentativa, diferentes tipos de técnicas de implantes dentários foram produzidos, bem como variados materiais eram utilizados com o intuito de reabilitar pacientes desdentados parcial ou totalmente. Adams (1937) patenteou um implante cilíndrico com espiras que apresentava estrutura esférica, parafusada na base para retenção de overdenture, um aspecto similar ao que se faz atualmente (apud Abraham, 2014).

O pouco conhecimento da fisiologia óssea, seus mecanismos de reparo e remodelação tecidual, aliados ao uso de materiais não biocompatíveis com o tecido ósseo, resultavam no insucesso desses implantes, em curto período de tempo. Strock instalou o primeiro implante endósseo de longo prazo, em Harvard, em 1938. Esse implante era um parafuso de cromo-cobalto-molibdênio com conexão cônica para a cimentação de coroa tipo jaqueta. O implante permaneceu estável e assintomático até 1955, quando o paciente faleceu em um acidente de carro. Com isso demonstrou-se, pela primeira vez, que um implante endósseo foi tolerado em humanos com sobrevivência acima de 17 anos (apud Abraham, 2014).

Para a substituição dos dentes em processos alveolares sem altura óssea, foram desenvolvidos os implantes subperiosteais. Em 1943, Dahl implantou uma estrutura metálica na crista alveolar com projeções coronárias para a instalação da prótese. Muitas variações do desenho original dos implantes laminados foram fabricadas. Scialon, na França em 1962, desenvolve e introduz os implantes agulhados duplos, triplos ou enfileirados, que eram inseridos no tecido ósseo, formando uma base para sustentação protética. Tanto os implantes laminados como agulhados caíram em desuso, pois resultam em deiscência de sutura, não integração óssea, fratura da estrutura, infecção e perda óssea (Linkow; Miller, 2004).

A descoberta da osseointegração foi consolidada pelo pesquisador sueco, Dr. Per Ingvar Branemark, em 1965, momento a partir do qual ocorreu uma verdadeira revolução no campo da Odontologia, pois foi quando teve início a Implantodontia moderna. Foi apresentado, pela primeira vez na América do Norte, em 1978, um parafuso de titânio de dois estágios com forma radicular, instalado no fêmur de coelhos; após um período de reparo, notou-se que osteointegravam (Albrektsson et al., 1981).

Essa descoberta da osseointegração aconteceu quando o Prof. Branemark liderava um grupo de pesquisadores da Universidade de Gotemburgo, na Suécia, que estudava sobre a microcirculação sanguínea em medula óssea, em tíbias de coelho, com a utilização de microcâmeras de titânio. Após o período necessário de observação, era necessário remover essas câmeras do tecido ósseo. No entanto foi observado que havia forte interação entre a superfície de titânio da câmera e o tecido ósseo, o que impedia a remoção, e sem qualquer tipo de processo inflamatório que caracterizasse rejeição. A esse fenômeno Branemark denominou osseointegração (Albrektsson et al., 1986).

Albrektsson et al. (1981) publicaram artigos científicos sobre a utilização de implantes de titânio com formato de parafuso para reabilitação oral. Constituídos por titânio comercialmente puro com superfície usinada e instalados na região anterior da maxila ou mandíbula, os implantes eram sempre unidos para melhor distribuição da carga mastigatória e usados com alto índice de sucesso na reabilitação oral de pacientes desdentados totais. Os estudos mostraram sobrevivência prolongada em função, manutenção da margem óssea e significativa melhora do risco-benefício sobre todos os implantes que haviam sido usados até o momento.

A sua penetração no meio acadêmico e profissional tem revolucionado a reconstrução maxilofacial. Subsequentemente, vários desenhos de implantes e novas tecnologias têm sido confeccionados e a pesquisa em implantologia tem crescido exponencialmente (Albrektsson; Wennerberg, 2005).

2.2 Tratamento de superfície dos implantes dentários

2.2.1 Superfícies usinadas

Os primeiros implantes originais, utilizados por Branemark, eram usinados, sem nenhum tipo de tratamento de superfície adicional e tinham rugosidade mínima, por muito tempo foram reconhecidos como padrão ouro. Nos anos 1990, estudos experimentais compararam implantes usinados com aqueles que apresentavam aumento da rugosidade e mostraram melhor resposta biológica frente ao tecido ósseo (Wennerberg; Albrektsson, 2000).

Ao longo do tempo, modificações foram propostas para alterar a superfície de usinada para rugosa, com o propósito de aumentar a superfície de contato, bem como melhorar a estabilidade ao longo do processo de osseointegração. Também se observou que a morfologia da superfície rugosa do implante dentário desempenha importante papel no comportamento celular, pois pode afetar diretamente na adesão e na diferenciação celular, responsáveis pela osseointegração (Le Guehennec et al., 2007; Yeo et al., 2008; Schliephake et al., 2009).

Os processos de tratamento de superfície para alterar as características da rugosidade, composição química e energia, após o processo inicial de usinagem, podem ser divididos em métodos de adição (quando é acrescentado algum substrato, partículas, íons à superfície do implante); subtração (quando processos químicos e físicos removem parte da camada da superfície); associações dos dois métodos (quando, após os processos químicos e físicos, é acrescentado algum substrato, partículas, íons à superfície do implante) (Ciotti et al., 2007; Wennerberg; Albrektsson, 2009).

2.2.2 Superfícies modificadas por adição

A adição de hidroxiapatita (HA) à superfície dos implantes foi um dos primeiros métodos de tratamento propostos para se modificar a superfície destes após o processo de usinagem. Usualmente, as coberturas de hidroxiapatita mediam 50 a 70 micrômetros e eram aplicadas por meio da tecnologia de *spray* de plasma. O objetivo foi buscar interação química entre o implante revestido com HA e o tecido ósseo, bem como aumentar a área de superfície e a rugosidade para consequente contato osso-implante – BIC (Bone implant contact) mais forte, além de acelerar a reparação da interface óssea (Mazor; Cohen, 2003).

Esse método caiu em desuso, pois apresenta algumas desvantagens, como o alto custo de produção e fabricação. Ainda, estudos clínicos demonstram que, após a instalação do implante revestido com HA, observou-se o destacamento de camadas da HA do corpo do implante, o que resultou em falha na osseointegração (Costa et al., 2005).

Outro método de adição utilizado foi o de pulverização da superfície com *spray* de plasma de titânio (TPS), que resultaria num grande aumento da área de superfície, e também estimularia o processo de adesão por osteogênese. Esse método era caracterizado por gotejamento de metal fundido em alta velocidade, para ser espalhado sobre o corpo com espessura de 10 a 40 micrômetros. Essas partículas resfriam-se e solidificam-se; assim, apresentam aspecto final semelhante à lava vulcânica solidificada. Esse aspecto altamente rugoso, resultante do processo de pulverização de plasma de titânio, produz superfície com elevado grau de irregularidade, com valores de rugosidade superiores a 2 μ m favorecendo aderência e contaminação bacteriana, o que se traduz numa desvantagem para a utilização desse trabalhoso método de tratamento de superfície, por isso não é mais utilizado na atualidade (Sardinha et al., 2013).

A oxidação anódica representa método alternativo para modificar a superfície de implante por meio de tratamento eletroquímico e é patenteada pela empresa Nobel Biocare, na superfície Ti Unite® (TiUnite® – Nobel Biocare, Göteborg, Suécia) (Ellingsen; Lyngstadaas, 2008). O implante é colocado em uma célula eletroquímica que serve como ânodo. Quando um potencial elétrico é aplicado à amostra, ele gera reações de transferência de carga e íons – o que resulta em fluxo contínuo desses

íons na célula elétrica. Sob condições controladas, o campo elétrico guia o processo de oxidação que ocorre no ânodo (implante), do qual resulta o aumento da espessura da camada de óxido de titânio (TiO_2) (Huang et al., 2005).

A superfície modificada pela oxidação anódica melhora o desempenho biológico dos implantes. Estudo *in vivo* indica que a presença da camada de hidróxido de titânio promove a osteointegração mais rápida, de modo que melhora tanto a quantidade como a qualidade do contato osso-implante – BIC. Em estudos *in vitro* observou-se aumento significativo da resposta dos osteoblastos com o nível mais elevado de proliferação celular e formação de fosfatase alcalina do que em uma superfície polida (Kim et al., 2013), tanto quanto após a oxidação anódica em cloreto de sódio – NaCl – e em peróxido de hidrogênio, em condições alcalinas-HOO- (Walter et al., 2013).

2.2.3 Superfícies modificadas por subtração

Dentre os métodos de tratamento de superfície por subtração, o jateamento com partículas representou a primeira modificação de superfície com aplicação clínica na década de 1990, com resultados promissores. Somente algum tempo depois foi complementada pelo condicionamento ácido (Albrektsson; Wennerberg, 2004).

A superfície modificada por jateamento tem como objetivo aumentar a irregularidade da superfície do implante, transformando a superfície usinada de baixa rugosidade numa superfície rugosa (Figura 2.5). Esse processo de tratamento é influenciado por número e velocidade de rotação do implante, pressão e dimensão das partículas utilizadas no jateamento. A alumina ou óxido de alumínio (Al_2O_3), bem como o óxido de titânio (TiO_2) são as partículas mais utilizadas. Esse tipo de tratamento mostrou melhor integração óssea do que as superfícies usinadas (Mueller et al., 2003).

Análises de espectroscopia de energia dispersa (EDS) da superfície dos implantes submetidos ao jateamento por alumina (Al_2O_3) demonstraram que resíduos provenientes das partículas utilizadas, durante o processo de jateamento, podem contaminar a superfície resultante no final do processo de tratamento, e essa

contaminação seria prejudicial à osseointegração, pois as partículas de alumina (Al_2O_3) inibem a formação de matriz mineralizada na fase de reparo ósseo. A substituição por óxido de titânio do mesmo material pode evitar os efeitos indesejáveis dessa contaminação por resíduos de alumina na superfície (Canabarro et al., 2008; Kawase et al., 2014).

A combinação de jateamento, seguido por condicionamento ácido – SLA (Sandblasted, Large grit, Acid etching), tem sido a técnica utilizada para o tratamento da superfície dos implantes, nos últimos anos. O tratamento de superfície SLA é realizado por processo de jateamento normalmente com partículas de titânio (TiO_2) ou alumina (Al_2O_3), o que permite controlar o tamanho das microcavidades resultantes. Algumas partículas remanescentes podem, no entanto, incorporar-se e contaminar a superfície do implante (Klein et al., 2010).

O condicionamento ácido remove algumas camadas da superfície deformada, o que reduz a possibilidade de contaminação da superfície por partículas que sobraram do processo, ou seja, ele atua na limpeza da superfície. Esses processos criam microcavidades sobrepostas à superfície áspera pré-moldada. A principal razão é que, hipoteticamente, o jateamento atinge rugosidade ótima de fixação mecânica, enquanto o condicionamento ácido suaviza a aspereza e pode adicionar componente de alta energia para a superfície do implante. Isso favorece a adesão da proteína, o que é considerado importante durante o processo mais rápido de reparo ósseo (Zhao et al., 2005; Rosa et al., 2013).

Além disso, após o tratamento de superfície SLA pode ser acrescentada outra característica que exerce influência no processo inicial de osseointegração, obtida quando, após o processo de jateamento e condicionamento ácido, a camada de óxido de titânio é mantida em contínua proteção de nitrogênio, armazenada em solução isotônica e esterilizada por irradiação gama. Esse processo aumenta a afinidade da superfície dos implantes dentários com a água, incrementa as características hidrofílicas e relaciona-se diretamente à energia superficial entre o implante e o meio fisiológico (Cochran et al., 2002), além de promover a maior taxa de diferenciação de osteoblastos em comparação a superfícies SLA (Zhao et al., 2007). Estudos *in vivo* mostram aumento do contato osso-implante com mais quantidade de angiogênese e maior torque de remoção, o que indica mais estabilidade durante a fase inicial de osseointegração (Ferguson et al., 2006).

As superfícies de titânio podem ser obtidas por condicionamento ácido simples ou duplo. Em geral, o condicionamento ácido duplo é realizado pela imersão dos implantes em soluções de HCl (ácido clorídrico) + H₂SO₄ (ácido sulfúrico), HNO₃ (ácido nítrico) + HF (ácido fluorídrico), ou apenas em solução de HNO₃ (Zhao et al., 2007).

No duplo condicionamento ácido, o implante é novamente imerso em solução aquosa de HNO₃ para estabilizar a camada de TiO₂. Tal procedimento potencializa a ativação das plaquetas e retém o coágulo de fibrina mais eficientemente do que em superfícies lisas, que são eventos importantes em estágios iniciais da integração de materiais com os tecidos biológicos *in vivo* (Di Iorio et al., 2005).

Vários tipos de laser são estudados para a modificação da superfície, como o laser Nd: YAG (ítrio-alumínio dopado com neodímio) (Wang et al., 2014), irradiação de UVC (ultravioleta C) ou UVA (ultravioleta A) (Gao et al., 2013), com laser KrF (Fluoreto de krypton) (Györgyey et al., 2013) e com laser Er:YAG (ítrio-alumínio dopado com érbio) (Ayobian-Markazi et al., 2013).

Alguns tipos de laser como Nd (YAG, KrF), Er(YAG), além de atuarem no processo de limpeza das superfícies são capazes de produzir uma superfície rugosa. Estudos sugerem que a superfície resultante da modificação por irradiação por feixes de laser resultam em superfície com microcrateras mais regulares. A aplicabilidade do laser como meio de tratamento de superfície de implantes dentários mostra-se viável, pois representa processo padronizável e relativamente fácil, além de limpo, reproduzível e de baixo custo (Wang et al., 2014).

Implantes com nanotecnologia são aqueles que, durante o processo de modificação, apresentam como resultado uma superfície com nanoestruturas, ou rugosidades em nível nanométrico. A presença de nanoestruturas é comum à maioria das modificações utilizadas no tratamento de superfície dos implantes dentários e, mesmo nos primeiros implantes originalmente desenvolvidos pelo Prof. P.I Branemark, já era possível encontrá-las, resultantes do processo de usinagem. Hoje, a nanotecnologia tem encontrado inúmeras possibilidades para a implantologia moderna (Wennerberg; Albrektsson, 2000; Li et al., 2014; Zuo et al., 2013; Goldman et al., 2014; Tan et al., 2014; Zhuang et al., 2014).

A melhoria da formação de osso na interface do implante é influenciada pelas características nanométricas, que tem a capacidade de induzir a diferenciação de células mesenquimais. O processo envolve a criação de materiais na escala

nanométrica (1-100 nm). A aplicação da nanotecnologia para superfícies dos implantes dentários é explicada pela capacidade das células de interagir com superfícies nanométricas (Bressan et al., 2013).

Devido a biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade que promovem osteogenese e osteocondutividade, o revestimento com fosfato e cálcio (CaP) – tem sido utilizado como nanotecnologia no tratamento de superfície dos implantes dentários (He et al., 2013). Esse processo pode ser encontrado associado aos processos subtrativos de tratamento de superfície, como no duplo condicionamento ácido ou no jateamento associado a condicionamento ácido. Vários estudos sugerem que as células apresentam mais afinidade ao CaP do que a outros substratos, tais como metais ou polímeros (Bucci-Sabattini et al., 2010). Além disso, a nanotopografia foi capaz de induzir a diferenciação celular com maior taxa de atividade da fosfatase alcalina (Zambuzzi et al., 2014).

2.3 Osseointegração

2.3.1 Conceito

A osseointegração foi definida, em 1969, por P.I Branemark, como uma conexão direta, estrutural e funcional entre osso vital organizado e a superfície de um implante de titânio capaz de receber carga funcional (Albrektsson et al., 1981). Albrektsson et al. (1986), complementaram o conceito da osseointegração como: Fixação rígida de material aloplástico no osso, que é obtida e mantida sob cargas funcionais e clinicamente assintomática.

2.3.2 Requisitos para a osteointegração

Os principais requisitos são necessários ao efetivo processo de osteointegração:

Material do implante: o titânio comercialmente puro (Ticp) tem excelente biocompatibilidade e propriedades mecânicas adequadas. A resistência do titânio tem direcionado os fabricantes a usarem liga desse material para melhorar essa propriedade, visto que os implantes fabricados em titânio puro apresentam módulos de resistência inferiores aos fabricados com ligas compostas de titânio (Schenk; Buser, 1998). A ASTM (American Society for Testing and Materials) elaborou classificação padrão para o titânio puro e algumas ligas vendidas comercialmente. Os graus de 1 a 4 definem o titânio comercialmente puro, enquanto os demais definem algumas ligas com grande aplicação industrial. A liga metálica mais utilizada é a de grau 5, composta por alumínio e vanádio (Ti6Al4V), na proporção de 90% de titânio, 6% de alumínio e 4% de vanádio, para dar mais resistência, dureza e aumentar o módulo de elasticidade (Sykaras et al., 2000). Recentemente, a liga homogênea de titânio-zircônio (TiZr) foi introduzida para melhorar a resistência à tração dos implantes de menor diâmetro. O sucesso clínico e a taxa de sobrevivência de 12 meses foram semelhantes aos implantes de titânio grau 4 (Quirynen et al., 2014).

Desenho do implante: é muito importante, para aumentar a superfície de contato com o tecido ósseo, bem como favorecer a estabilidade primária já no ato cirúrgico de instalação. Essa macrogeometria dos implantes dentários compreende também formato e espaçamento das roscas, pois elas influenciam diretamente na estabilidade primária, compressão óssea e velocidade de inserção no alvéolo ósseo; deve ser selecionada conforme as particularidades de cada caso (Stadlinger et al., 2012).

Superfície do implante: também pode ser denominada de microgeometria do implante dentário e é responsável por interagir biologicamente em níveis microscópicos com o tecido ósseo, por meio de adesão e fixação das células responsáveis pelo processo da osseointegração. Além disso, os tratamentos de superfície dos implantes reduzem consideravelmente o tempo de integração (Albrektsson; Wennerberg, 2004).

Leito ósseo receptor: a avaliação da qualidade e da quantidade de tecido ósseo é de extrema importância para o planejamento e o sucesso da reabilitação com implantes dentários. A qualidade óssea, presente na maxila ou na mandíbula, pode ser classificada em quatro tipos principais, segundo Lekholm e Zarb: osso tipo 1: osso alveolar constituído em sua maioria de osso cortical denso; osso tipo 2: osso cortical espesso que envolve núcleo de osso medular; osso tipo 3: osso cortical fino, com núcleo de osso medular trabeculado; osso tipo 4: osso cortical fino com núcleo de osso medular de baixa densidade – o mais frágil tipo de tecido ósseo, que pode ser encontrado na região maxilar (Schenk; Buser, 1998).

Estabilidade primária e carga adequada: a estabilidade primária deve neutralizar todos os micromovimentos entre o implante e os tecidos circundantes. A preparação cirúrgica deve ser criteriosa e respeitada a qualidade óssea presente por meio de fresagem de forma escalonada, controle da velocidade e do calor gerado no momento dessa fresagem, para que na instalação do implante dentário obtenha-se carga primária o mais próximo do ideal para cada fabricante, entre 35 a 45N. Para a carga adequada deve ser considerado não só o tamanho, como também a direção das forças. Para alguns casos, a carga funcional é mais bem distribuída com uso de estrutura metálica, enquanto outros casos exigem período mais prolongado de cicatrização óssea (Schenk; Buser, 2000).

Técnica cirúrgica: as novas tecnologias dos materiais e instrumentais não substituem a adequada técnica cirúrgica de inserção do implante dentário, sem traumatismo de tecidos moles e duros. Durante o processo escalonado de fresagem do leito ósseo, a temperatura não pode ultrapassar 42°C para não ocorrer a desnaturação das proteínas do osso, o que resulta numa necrose óssea superficial. A irrigação abundante com soro fisiológico, o controle do tempo, da velocidade da fresagem e respeito ao tempo útil das brocas são necessários para evitar esse aquecimento. Os cuidados com o tecido mole, conforme requisitos básicos de incisão e divulsão sem dilacerar as bordas, aliados à sutura correta são extremamente desejáveis para o completo sucesso da cirurgia (Block; Kent, 1990).

2.3.3 Processo de reparo

O osso é gerado por dois mecanismos: formação óssea endocondral e intramembranosa. A formação intramembranosa, ou reparo primário, requer a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos, que produzem tecido osteóide-mineralizado para formar o osso. Esse tipo de formação óssea ocorre na calvária, na maioria dos ossos da face e na clavícula. A osseointegração pertence à categoria de reparo ósseo primário. O processo de reparo constitui-se em cascata de eventos fisiológicos em que a indução da formação óssea na interface cirúrgica reflete mais alteração no ambiente celular. Esses eventos cruciais envolvem três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação (Schenk; Buser, 2000).

2.3.3.1 Primeira fase: fase inflamatória

O contato das plaquetas com a superfície do implante causa a liberação de grânulos intracelulares que resultam no tampão hemostático. As plaquetas continuam a degranular, e fatores responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular contribuem com a resposta inflamatória que acompanha a lesão tecidual. O processo inicial, principalmente mediado por neutrófilos, atinge seu pico máximo de concentração nos primeiros 3 a 4 dias. A função dessas células é primeiramente fagocitose e digestão de restos tissulares que é complementada por macrófago ao redor do quinto dia e permanecem até a sequência reparativa. (Schenk; Buser, 2000).

2.3.3.2 Segunda fase: fase proliferativa

Quando ocorre a neovascularização com o desenvolvimento microvascular das adjacências do tecido ósseo, como também a formação do tecido conjuntivo imaturo por meio da ativação, proliferação e diferenciação celular. As células locais

inflamatórias proliferam no interior da ferida e iniciam a formação de colágeno. A combinação do estado de hipóxia do tecido de granulação na formação pelo colágeno, rede de capilares e certas citocinas, é responsável pelo estímulo da angiogênese. Células mesenquimais indiferenciadas do local iniciam sua diferenciação em fibroblasto, osteoblasto e condroblasto. Essas células produzem matriz extracelular composta de colágeno, glicosaminoglicanas, glicoproteínas e glicolipídeos. Tecido fibroso inicial e substâncias básicas são depositados e, eventualmente, formam calo fibrocartilaginoso. O osso inicial depositado é formado ao acaso, e a formação do osteóide domina claramente o processo de reparo dessa fase até 4 a 6 semanas de cirurgia (Schenk; Buser, 2000).

2.3.3.3 Terceira fase: fase de maturação

Os osteoblastos diferenciados secretam matriz colagenosa e contribuem para sua mineralização. O osso do tipo osteóide, no interior da matriz do tecido conjuntivo vascularizado, depositado na interface cirúrgica do implante é chamado de osso entrelaçado. O carregamento sobre os implantes estimula a transformação de osso entrelaçado para osso lamelar; que é um osso organizado, disposto com arquitetura haversiana. Com o passar do tempo mostra um padrão de lamelas concêntricas bem organizadas com formação de ósteons. Em circunstâncias normais, o reparo dos implantes é usualmente associado com redução da altura vertical da margem do osso alveolar de aproximadamente 0,5 a 1,5 mm durante o primeiro ano após a instalação do implante (Schenk; Buser, 2000).

2.4 A influência da superfície do implante na osseointegração

As características físico-químicas da superfície influenciam proliferação, diferenciação celular, síntese da matriz extracelular, produção de fatores locais; além de promover mais rapidamente a formação do osso, com mais estabilidade,

durante o processo de osteointegração, o que permite a colocação mais rápida de carga no implante (Huang et al., 2005).

O grau de reparação óssea nas fases iniciais é crítico para a determinação da estabilidade mecânica do implante e o tempo da osseointegração com implantes dentários, sem modificações de superfície, é geralmente de 16 a 24 semanas (Wennerberg; Albrektsson, 2000). Com tratamento de superfície, o tempo pode ser reduzido para 6 a 8 semanas, considerada uma vantagem clínica de curto período de espera para colocar carga no implante. Também é especialmente indicado para casos em que há comprometimento do metabolismo ósseo local ou sistêmico, por exemplo, na presença do osso tipo 4 e em paciente com diabetes *mellitus* (Klein et al., 2010; Rosa et al., 2013).

2.4.1 Características dos tratamentos de superfície dos implantes

As características da superfície, obtidas com diferentes tratamentos, dependem do tipo da partícula utilizada, da dureza, do tamanho, da velocidade de impacto, da temperatura, das concentrações e do tempo de exposição das substâncias. Cada fabricante tem seu método próprio para obter a característica superficial desejada (Rosa et al., 2013).

2.4.2 Modificação da rugosidade

Diferentes processos de fabricação modificam a rugosidade da superfície e resultam na formação de relevos, em escalas mensuráveis: macrométricas, em milímetros (mm); micrométricas, em micrômetros (μm); submicrométricas, acima de 100-150 nanômetros (nm) e inferiores a 1 μm ; e nanométrica (nm) (Webster et al., 2005). A influência dessas estruturas na osteointegração têm sido tema de várias publicações e estudos nos últimos anos.

A microtopografia do implante estimula a formação óssea, por gerar ambiente tridimensional favorável às interações célula-célula e célula-matriz extracelular. O

aumento gradual da microtopografia, em células osteogênicas cultivadas, reduz a proliferação e aumenta a diferenciação celular, do que resultam níveis elevados de atividade de fosfatase alcalina (ALP) e de síntese de osteocalcina (Schwartz et al., 2009; Perroti et al., 2013; Chen et al., 2014). Observa-se também aumento na produção de fatores de crescimento que promovem a osteogênese (TGF- β 1) (Boyan et al., 2003). Ainda, diminui fatores de necrose local (TNF- α) como também aumenta a produção de fosfatase alcalina e expressão de adesão de proteína (integrina α 3 β 1) (Pivodova et al., 2013; Lai et al., 2014). Também diminui as moléculas que reduzem a formação e a atividade de osteoclastos, como a osteoprotegerina (OPG), secretada por osteoblastos (Bang et al., 2014). Outros estudos mostram sinergismo em respostas teciduais a associações de micro e submicrotopografias (Schwartz et al., 2007; Klein et al., 2013).

As atividades celulares são também influenciadas pela nanotopografia (Thalji et al., 2013). De fato, as complexas interações célula-matriz substrato ocorrem na escala nanométrica e estão associadas aos eventos de sinalização celular por meio de transdução de sinais. Diferentes vias de sinalização celular regulam os fenômenos de adesão, migração, diferenciação e expressão gênica em células da linhagem osteoblástica (Daw et al., 2013; Zambuzzi et al., 2014). Diferentes nanotopografias podem influenciar a adsorção de proteínas, a adesão celular, a proliferação celular, síntese e secreção de moléculas da matriz extracelular e, conseqüentemente, o processo de formação tecidual *in vitro* (De Oliveira; Nanci, 2004; He et al., 2013).

2.4.3 Modificação química e da energia de superfície

A modificação química da superfície com diversos tipos de condicionamento ácido e revestimento de moléculas como BMP (proteína óssea morfogenética), fator de crescimento, laminina, cálcio, fosfato e/ou outros íons altera a energia da superfície e proporciona meios de interação e funções celulares específicas (Goldman et al., 2014).

A energia da superfície está relacionada com a afinidade da superfície com a água. Algumas alterações da superfície resultam em modificações químicas,

melhorando a energia da superfície. Quanto mais elevado o nível de energia, mais hidrofílica é a superfície, característica que demonstra mais afinidade por adsorção de átomos e moléculas. Assim, em teoria, implantes que possuem superfície com maior índice de energia superficial apresentarão valores de osseointegração superiores, se comparados a implantes com energia superficial baixa (Ayobian-Markazi et al., 2013).

Por todas essas modificações resultantes de cada tipo de tratamento de superfície, a descrição apenas do seu nome não define as características físico-químicas da superfície. Esta caracterização deve ser realizada corretamente, de forma a possibilitar a definição dos aspectos físico-químicos resultantes do processo de fabricação do tratamento de superfície de cada sistema (Wennerberg; Albrektsson, 2010).

2.4.4 Caracterização do tratamento de superfície

A correta caracterização da rugosidade da superfície dos implantes pode ser realizada por meio da luz do interferômetro ou do perfilômetro óptico e/ou microscópio de força atômica (Albrektsson; Wennerberg, 2004; Liu et al., 2013). A caracterização da rugosidade do implante com roscas deve ser aferida com mensurações do topo, vale e flancos das espiras. Além disso, a caracterização deve ser avaliada de acordo com a descrição dos parâmetros das rugosidades, que são: o desvio da média aritmética da altura da rugosidade (R_a), a área de superfície (S_a), a densidade de rugosidades (S_{ds}), que é o número de picos por unidade de área, e dos parâmetros híbridos (S_{dr}), que representa a relação entre a área da superfície tratada e uma referência plana (Wennerberg; Albrektsson, 2009).

O ângulo de contato caracteriza a afinidade da superfície com a água por meio de um líquido de teste (água destilada). Os ângulos de contato são medidos em implantes de titânio por meio de um instrumento. A água destilada é depositada sobre a superfície do implante e imediatamente fotografada por meio de microscópio óptico acoplado à câmera (Figura 2.17) (Ayobian-Markazi et al., 2013).

A caracterização qualitativa da superfície é realizada por meio do microscópio eletrônico de varredura – MEV, que avalia o padrão de distribuição do tratamento de

superfície ao longo do corpo do implante, podendo ter resultado uniforme ou não. A presença de elementos químicos é detectada por meio da espectroscopia de energia (EDS), a qual avalia a presença de carbono, Al_2O_3 , entres outros elementos remanescentes do processo de fabricação que podem interferir no processo de osseointegração. Além disso, identifica-se presença de flúor, cálcio, fosfato, entre outros revestimentos, propositalmente para melhorar o processo de osseointegração (Müeller et al., 2003; He et al., 2013; Oliveira et al., 2014; Uchiyama et al., 2014).

Mesmo assim, a interpretação da resposta dos tecidos em relação às modificações das superfícies é complexa, pois após alterar a rugosidade da superfície, a composição química e a energia também são alteradas mesmo que esse efeito não seja planejado. Além disso, quando a microtopografia da superfície é alterada, a nanotopografia da mesma superfície também sofre mudanças (Wennerberg; Albrektsson, 2009).

2.4.5 Mecanismo de interação das células com a superfície dos implantes

Compreender o modo pelo qual as células interagem com os materiais é tema importante na área da engenharia de tecidos e dos biomateriais. Na osseointegração, as células ósseas aderem à superfície do implante por meio da matriz extracelular (MEC), compostas por proteínas e proteoglicanos. As interações entre a célula e a superfície definem a qualidade da interface da célula-implante e do tecido-implante. Após alguns segundos de contato entre a superfície e o fluido intersticial, a superfície torna-se revestida por água e proteínas. Assim, as células percebem as características da superfície através desta camada adsorvida da MEC (Anselme et al., 2010).

As primeiras células ósseas aderem por meio de interações físico-químicas, tais como: forças iônicas e as forças de Van der Waals. As moléculas-chave no processo de adesão são os receptores da membrana celular, chamados integrinas – subunidade alfa (α) e beta (β), que formam receptores específicos para as sequências de aminoácidos, como o ácido arginina-glicina-aspartico (RGD), presente em muitas proteínas da MEC (Lai et al., 2014).

Esses receptores de integrina atuam como interface entre os compartimentos intra e extracelular. No lado extracelular, eles interagem com a MEC; no lado intracelular, interagem com as moléculas do citoesqueleto e com moléculas de sinalização aos locais de adesão, chamados adesões focais. Após adesão e espalhamento, as células garantem a forma estável, mantida por fibras de actina por todo o corpo celular. Se necessário, as células são capazes de migrar, a fim de encontrar lugar mais adequado para o seu desenvolvimento. Com a migração, elas se dividem e proliferam em toda a superfície (Ingber, 2006).

Além disso, as células interagem de forma diferente em relação à topografia da superfície. Nos implantes com superfície usinada, as células tendem a aderir, pela orientação paralela aos riscos decorrentes ao processo de usinagem (característica anisotrópica). Esse fenômeno é chamado "orientação de contato" e foi observada apenas *in vitro*. Vários estudos mostram que os filipódios são ferramentas da célula para explorar os arredores da superfície, antes da sua migração para a área (Fujita et al., 2009). Na superfície rugosa, as células aderem-se e proliferam ao longo de toda a extensão da superfície (característica isotrópica). Note-se que as células são capazes de identificar e distinguir entre superfícies côncavas e convexas; inclusive aderem e migram mais sobre as estruturas convexas, do que sobre as côncavas (Park et al., 2009). Todas essas interações bioquímicas e mecânicas são transferidas por transdução de sinal para o núcleo, que induz à morte celular, por meio de apoptose, se a aderência não foi possível; ou a crescimento e diferenciação celular, se adesão e espraiamento celular foram alcançados (Fujita et al., 2009; Park et al., 2009).

2.5 Formas de avaliação

A avaliação da resposta do tecido ósseo aos diferentes tratamentos de superfície dos implantes dentais pode ser realizada por diversos tipos de estudos científicos, como avaliações clínicas da perda de osso marginal, tempo de sobrevivência do implante e biópsia, estudos *in vivo*, como avaliação histológica, histomorfométrica e análise do torque de remoção do implante (Wennerberg; Albrektsson, 2009). Os estudos *in vitro* são amplamente utilizados para a avaliação

da interação das células ósseas, vasculares ou de fibroblastos com os diferentes tratamentos de superfície do titânio, em relação a: adesão, proliferação e diferenciação celular (Anselme et al., 2010).

Cada tipo de estudo científico tem diferentes potenciais de influenciar práticas clínicas devido a aspectos metodológicos do seu delineamento. A escolha do tipo de estudo mais adequado deve ser baseada no objetivo da pesquisa e em fatores práticos, como questões éticas, amostra, tempo, custos e recursos disponíveis. A pesquisa laboratorial *in vitro* é relacionada aos tipos de estudo mais rápido, prático, sensível, seguro, eficiente e com bom custo benefício, porém com baixo potencial de estabelecer evidências diretamente aplicáveis à prática clínica (Forrest; Miller, 2001).

2.5.1 Metodologia dos estudos *in vitro* de tratamento de superfície em modelo de osteointegração

2.5.1.1 Protótipo de estudo e meio de cultura

A maioria dos estudos que avaliam a interação celular utilizam discos de titânio com os seus respectivos tratamentos de superfície submetidos a análise em meio líquido de cultivo (Klein et al., 2013). A utilização do implante, em forma de parafuso é o protótipo de estudo ideal, pois é o que mais se aproxima da aplicação clínica, embora a metodologia se torne mais difícil (Liu et al., 2013).

Em modelos de estudos que avaliaram os implantes no formato original do parafuso, utilizou-se meio de cultura semissólido com 0,5% de Ágar com bons resultados (Conserva et al., 2013; Liu et al., 2013).

2.5.1.2 Tipo de célula

Vários tipos de células são utilizados, como as linhagens de células primárias ou permanentes. As células primárias são extraídas a partir de tecido normal e

saudável. Seu fenótipo é muito próximo de células do tecido original e, em geral, mais difíceis de cultivar *in vitro*. As linhagens de células permanentes são extraídas pela imortalização de células primárias ou derivadas de tumores ósseos. A principal vantagem dessas células é a alta capacidade de proliferação, no entanto o fenótipo pode ser ligeiramente diferente do tecido original (Anselme et al., 2010). Por outro lado, as células mesenquimais têm sido utilizadas e foram consideradas mais sensíveis que os osteoblastos na liga Ti6Al4V com tratamento de superfície (Calzado-Mart et al., 2014).

2.5.1.3 Adesão celular

Para avaliação da adesão celular, a microscopia eletrônica de varredura e os ensaios de imunofluorescência foram os métodos mais utilizados. A avaliação quantitativa da taxa de adesão celular foi calculada em relação a porcentagem entre a área de adesão celular com a mesma área do implante sem célula (Liu et al., 2013). E o estágio da adesão e o espreado celular foram avaliados qualitativamente em células esféricas, com filipódios, com filipódios e lamelipódios, e células espiadas (Conserva et al., 2013) .

2.5.1.4 Viabilidade e crescimento celular

A quantificação celular é utilizada para definir a viabilidade celular e as condições de crescimento. Existem duas maneiras de quantificar células em cultura, na forma direta, o método mais utilizado é a contagem em câmara de Neubauer, com contagem direta do número de células; na indireta, quantificam-se determinadas estruturas celulares, como proteínas, ou pela medição do metabolismo celular. Existem muitas técnicas baseadas no metabolismo celular ou até mesmo na dosagem de macromoléculas presentes na célula, como as proteínas ou o DNA (Freshney, 2010).

Dentre as formas indiretas de contagem celular, o teste de brometo 3 – [4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio] baseia-se na redução do MTT, um sal tetrazólico, pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis para obter como produto o azul de Formazan. O ensaio mede a respiração celular, que é proporcional à quantidade de Formazan produzida e ao número de células viáveis em cultura. A vantagem desse método é a contagem somente do número das células viáveis (Mosmann, 1983).

2.6 Estudos comparativos do tratamento de superfície comercialmente disponível

2.6.1 Estudos *in vivo* comparativos do tratamento de superfície comercialmente disponível

Em tratamentos de superfícies comercialmente disponíveis dos implantes tratados com jateamento e partículas de hidroxiapatita, duplo condicionamento ácido e jateamento mais condicionamento ácido, os respectivos valores de Ra foram de 0,76, 0,80 e 2,10 μm . Os implantes foram avaliados por 48 meses, com taxa de sucesso igual a 100% e perda óssea marginal < 1mm (Mazor; Cohen, 2003).

O tratamento de superfície experimental com oxidação de Magnésio (Mg) foi comparado com superfícies comercialmente disponíveis, por duplo condicionamento ácido e oxidação anódica. Os respectivos valores de Sa foram: de 0,69; 0,72; 1,35 μm . Após 3 e 6 semanas, os implantes com superfície modificada por oxidação de Mg mostraram maior torque de remoção e contato ósseo significativamente maior com relação ao duplo condicionamento ácido e sem diferença estatística significativa, quando comparado à oxidação anódica (Sul et al., 2006).

Estudos clínicos e *in vivo* mostraram que a resposta óssea foi influenciada pela rugosidade da superfície do implante na escala micrométrica. Uma superfície com a Sa de 1-2 μm tem mostrado melhores resultados (Wennerberg; Albrektsson, 2009). Estudos demonstraram que os implantes de titânio, com correta rugosidade, podem melhorar o contato osso-implante. Por outro lado, o aumento da rugosidade

da superfície, com Sa acima de 2 μm , provoca redução do contato osso-implante, diminuindo o valor de torque de remoção. Há também algumas indicações de que as respostas ósseas são influenciadas pela alteração da superfície em nível nanométrico (Wennerberg; Albrektsson, 2010).

2.6.2 Estudos *in vitro* comparativos do tratamento de superfície comercialmente disponível

Quando estudos *in vitro* compararam diferentes tratamentos de superfície comercialmente disponíveis e seus efeitos biológicos nas células ósseas, vários resultados foram encontrados. Liu et al. (2013) mostraram diferentes resultados em relação à adesão celular em superfícies comercialmente disponíveis, a partir de quatro sistemas de implantes dentários: duplo condicionamento ácido com revestimento de cálcio e fosfato (A); duplo condicionamento (B); oxidação anódica (C); jateamento e condicionamento ácido; (D) com a proteção de nitrogênio, mantido em meio fisiológico. Os valores da rugosidade em relação ao flanco, topo e vale dos respectivos implantes foram: 0,4; 0,6; 0,5 μm (A); 1,6; 1,7; 1,5 μm (B); 1,3; 0,5; 0,8 μm (C); 1,9; 1,5; 1,3 μm (D). A rugosidade mais uniforme entre o flanco, topo e vale dos implantes do sistema B e D foi responsável pela maior taxa de adesão.

Foram também estudados seis tratamentos de superfície comercialmente disponíveis: usinado (A), jateamento (B e C), duplo condicionamento ácido (D), SLA (E) e oxidação anódica (F). Os respectivos valores de Sa 0,81 (A); 0,72 (B); 3,2 (B); 0,86 (D); 2,93 (E); 0,76 (F) μm . Todos os implantes testados suportaram adesão, proliferação e diferenciação celular, sem efeitos de citotoxicidade. A morfologia celular nos tempos de 6, 24 e 72 horas foi influenciada pelo tratamento de superfície de jateamento que alterou a rugosidade da superfície em nível micrométrico (C). Células Saos-2 proliferaram mais rapidamente nas superfícies com jateamento. Superfícies usinadas mostraram menos proliferação celular na observação por meio do MEV. A superfície com jateamento mostrou maiores valores da atividade fosfatase alcalina (Conserva et al., 2013).

A nanotopografia da superfície Ossean-Intra-Lock[®] foi avaliada em dois estudos. O primeiro foi comparado com superfície modificada apenas por jateamento

e condicionamento ácido, e os resultados mostraram melhor comportamento celular na superfície Ossean[®], com níveis mais elevados de diferenciação celular (Bucci-Sabattini et al., 2010). O segundo estudo foi comparado com os tratamentos de superfície: jateamento e condicionamento ácido, duplo condicionamento ácido e usinado. Tanto a superfície Ossean[®] como a aquela com jateamento e condicionamento ácido apresentaram nanotopografia e foram capazes de induzir fosfatase alcalina. Só que a fosforilação de FAK foi significativa apenas para a superfície com jateamento e condicionamento ácido, sugerindo que as vias de sinalização que envolve FAK podem fornecer marcadores importantes para o reconhecimento de estruturas nanométricas para adesão celular. No entanto, a importância da nanotopografia e a composição química da superfície na interação celular ainda devem ser determinadas (Zambuzzi et al., 2014).

2.6.3 Estudos comparativos dos tratamentos de superfícies dos implantes fabricados no Brasil

O Brasil é atualmente um dos maiores mercados de implantes do mundo. A produção de implantes mundial é estimada em 2 milhões de unidades por ano, das quais 79% são fabricadas no Brasil. Além disso, algumas dessas empresas exportam seus implantes para a América Latina, Estados Unidos, Canadá, Europa, Ásia e Oriente Médio. Devido ao baixo preço de seus implantes, eles podem se tornar muito competitivos no mercado mundial, se a qualidade de produção corresponder à dos principais fornecedores do mercado internacional. No entanto, muito pouco foi publicado sobre estudos comparativos das características físico-químicas das superfícies dos sistemas de implantes brasileiros (Rosa et al., 2012).

Rosa et al. (2013) avaliaram a rugosidade dos tratamentos de superfície de cinco empresas brasileiras (Bonelike-HE e Bonelike-CM - Biomet 3i do Brasil[®]; SIN-HE e SIN-SW - SIN[®]; Master Actives porous e Vulcano - Conexão[®]; Titamax medular, Titamax Cortical e Titamax-EX - Neodent[®] e Titaniumfix[®]), comparada à de tratamentos de superfície correspondentes de empresas internacionais (SLA Implante SLA - Straumann, Osseotite - Biomet 3i, TiUNite-Nobel Biocare). Os valores da rugosidade da superfície variaram consideravelmente em relação aos implantes

de referência. Os valores mais baixos foram observados no grupo de implantes submetidos a jateamento e condicionamento ácido e apenas condicionamento ácido; os maiores valores foram obtidos no grupo tratado com duplo condicionamento ácido e oxidação anódica. Além disso, foram observadas diferenças estatisticamente significativas da rugosidade da superfície entre os lotes dos implantes de todas as empresas nacionais, o que indica uma variação substancial na topografia do implante de um lote para outro. Neste estudo não foi avaliada a interação celular que pode ser influenciada por essas diferentes características das superfícies dos implantes nacionais.

3 PROPOSIÇÃO

Frente à revista de literatura, propusemo-nos a comparar *in vitro* a influência dos tratamentos de superfície de quatro tipos de implantes dentários disponíveis comercialmente no Brasil, no processo de interação com as células ósseas.

- 1- Caracterizar qualitativamente os tratamentos de superfície de quatro implantes dentários em relação à topografia.
- 2- Comparar a interação das células ósseas com as diferentes características físico-químicas dos tratamentos de superfície dos quatro implantes dentários em relação a: adesão, viabilidade celular e crescimento celular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Implantes

Implantes comercialmente disponíveis de três empresas foram doados pelos fornecedores: Intra-lock[®], nano superfície ossean[™] (3,75 x 10 mm Boca Raton, Flórida, Estados Unidos); SIN[®], superfície ativada (3,75 x 10 mm - SIN Sistema de Implantes, São Paulo-SP, Brasil); Conexão, superfície Porous[®] e Actives Vulcano[®] e Porous (3,75 x 10 mm, Conexão Sistemas de Próteses, Arujá - SP, Brasil).

O comprimento dos implantes das diferentes empresas foi padronizado para a finalidade de comparação. Os tipos de tratamentos de superfície foram nomeados como superfícies: A, B, C e D para facilitar o entendimento (Tabela 4.1):

- A – jateamento, associado a condicionamento ácido com revestimento de cálcio e fosfato,
- B - duplo condicionamento ácido,
- C - condicionamento ácido,
- D - oxidação anódica.

Tabela 4.1 – Descrição dos implantes utilizados no estudo (marca, nome da superfície no experimento e no tratamento, descrição do implante, largura (mm), comprimento (mm), identificação no catálogo e número de amostras usadas no experimento).

Marca	Nome da superfície no experimento e no tratamento	Implante	Amostras	Largura (mm)	Comprimento (mm)	Identificação no catálogo
Intra-lock® (A)	Nano superfície ossean™ (jateamento + condicionamento ácido + revestimento de CaP)	HEX Blossom	18	3,75	10	3.7510HBSD
SIN® (B)	Superfície ativada (duplo condicionamento ácido)	Strong SW HE	28	3,75	10	SCW3710
Conexão® 1 (C)	Porous (condicionamento ácido)	Master Porous Grip	23	3,75	10	51971099
Conexão® 2 (D)	Actives Vulcano (bio anodizada)	Master Actives Grip	23	3,75	10	52971099

4.2 Caracterização dos tratamentos de superfície dos implantes

Todos os implantes foram retirados de sua embalagem original, utilizando a chave curta de instalação para contra-ângulo específico de cada sistema, para se evitar o contato com a superfície do implante e foram manipulados com pinça de titânio estéril. Paramentação básica, com uso de gorro, óculos de proteção, máscara, avental descartável e luvas de látex estéril foi utilizado em todos os procedimentos.

4.2.1 Caracterização quantitativa do tratamento de superfície

Os dados da rugosidade das superfícies foram utilizados de acordo com as mensurações anteriormente relatadas nos estudos de Rosa et al.(2013) e Zambuzzi et al. (2014), de acordo com a Tabela 4.2

Tabela 4.2- Descrição nos trabalhos anteriores das rugosidades dos tratamentos de superfície estudados. (Estudos, protótipo de estudo, nome da superfície comercialmente disponível, equipamento utilizado para caracterização e resultados Sa, Sds, Sdr)

Estudo	Protótipo de estudo	Superfície comercialmente disponível	Equipamento utilizado para a caracterização	Resultados da caracterização		
				Sa	Sds (mm ²)	Sdr (%)
Zambuzzi et al., 2014	Disco de titânio	Nano superfície ossean™ - Intra-lock® System International	MFA Interferômetro	7,16 (nm) 0,99 (µm)	206,4	18,89
Rosa et al., 2013	Implante	Superfície ativada - SIN	Interferômetro	1,01 (µm)	165,05	92,67
Rosa et al., 2013	Implante	Porous Conexão	Interferômetro	0,55 (µm)	183	42,83
Rosa et al., 2013	Implante	Actives Vulcano Conexão	Interferômetro	1,26 (µm)	203,85	199,13

MFA = Microscópio de força atômica; Sa = desvio da média aritmética da altura; Sds (mm²) densidade; Sdr (%) parâmetro híbrido.

4.2.2 Caracterização qualitativa do tratamento de superfície

A caracterização qualitativa dos tratamentos de superfície foi avaliada por meio do microscópio eletrônico de varredura no Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO), do Departamento de Dentística, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Cada implante foi fixado no *stub* com fita adesiva de carbono dupla face. Um espécime de cada tipo de implante foi analisado, e as características da topografia das superfícies foram avaliadas qualitativamente por microscópio eletrônico de varredura (MEV) de emissão de campo (Leo 430 SEM, Leo Ltda., Cambridge, UK) operado a 20 kV, com aumento original de 10 x e 500 x (Conserva et al., 2013).

4.3 Cultivo celular

O cultivo celular foi realizado no Laboratório de Pesquisa Básica “Edmir Matson” do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sob a supervisão da Prof.^a Dr.^a Márcia Martins Marques.

O descongelamento celular foi realizado nas alíquotas congeladas em nitrogênio líquido e crioprotegidas por dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) de linhagem de células osteoblasto-símile denominada OSTE0-1 obtidas a partir de osso parietal de ratos recém-nascidos (Deboni et al., 1996), descongeladas em banho de água a 37°C por 2 minutos. Essa suspensão de células foi diluída 10x em tubo de ensaio contendo meio de cultivo DMEM (Invitrogen/Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 15% de soro fetal bovino – SFB (Invitrogen/Gibco, Grand Island, NY, EUA), 100U/mL de penicilina (Invitrogen/Gibco, Grand Island, NY, EUA), 100µg/mL de estreptomicina (Invitrogen/Gibco), 2mM de L-glutamina (Invitrogen/Gibco) e 2mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen/Gibco).

Após centrifugação dos tubos de ensaio a 300g por 5 minutos, os sobrenadantes foram descartados, e os corpos de fundo foram ressuspensos em meio de cultura fresco e transferidos para frascos de cultivo celular de 25cm² de área cultivável. Foram incubados a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ (Estufa, Forma Series II Water Jacketed CO₂ Incubator, Thermo Scientific).

O subcultivo celular foi realizado quando as monocamadas de células atingiram a subconfluência, ou seja, quando cerca de 70% da área cultivável do frasco estava coberta por células. Para isso, 5mL do meio de cultura foram removidos e reservados em tubo de ensaio, e a monocamada celular foi lavada duas vezes com solução de PBS (1X, Tampão Salino-Fosfato pH 7,2; LGC Biotecnologia). Para a remoção da monocamada celular, aderida ao fundo do frasco, foi utilizada solução de tripsina a 0,25%, contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1mM (Invitrogen/Gibco), por 3 minutos a 37°C. A tripsina foi inativada pela utilização de meio de cultura com SFB reservado anteriormente, e as células em suspensão foram transferidas para tubos de ensaio de 15mL e centrifugadas a 300g por 5 minutos em temperatura ambiente.

O sobrenadante foi descartado, e o precipitado de células ressuspensão em 1mL de meio de cultura fresco. Alíquotas dessa suspensão de células foram distribuídas em frascos de 75cm², com 15 mL de meio de cultivo. Os frascos foram novamente mantidos em estufa a 37°C, em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Cada procedimento de subcultura deu origem a uma nova passagem das linhagens celulares. Todos os experimentos foram realizados entre a quinta e a nona passagem.

Procedimentos de cultivo celular foram executados em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, SP, Brasil). Em seguida, foram aplicados protocolos de manutenção de esterilidade de materiais e soluções utilizadas (Freshney, 2010). Vale ressaltar que o crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio invertido de fase (Nikon TMS, Nikon, Melville, NY, EUA) e que o meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

4.3.1 Cultura de célula nos implantes

Primeiro foi confeccionado um dispositivo de acrílico para imobilização do implante no interior da placa de cultivo. Foi confeccionado com uso de canaleta para encapar trabalhos escolares. As canaletas foram cortadas no Labcut 1010 - Extec®, na espessura padronizada de 0,7cm por paquímetro manual – ICE e esterilizados em autoclave (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Confeção do dispositivo de acrílico. Canaleta para encapar trabalhos escolares(A). Cortadas em Labcut 1010 - Extec®(B). Espessura padronizada de 0,7cm por paquímetro manual – ICE (C)

Anteriormente, a biocompatibilidade desse dispositivo de acrílico foi comprovada pela ausência de formação de halo de inibição de crescimento celular, monitorado diariamente em microscópio invertido de fase (Nikon TMS, Nikon, Melville, NY, EUA) (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Eletronmicrografia de células OSTEO-1 crescidas no fundo da placa de cultivo ao redor do dispositivo acrílico. Observe-se a ausência de halo de inibição do crescimento celular em microscópio invertido de fase (Nikon TMS, Nikon, Melville, NY, EUA)

Posterior à confecção e esterilização do dispositivo acrílico, todos os implantes foram retirados da embalagem original, utilizando a chave curta de instalação para contra-ângulo de cada sistema para evitar o contato com a superfície do implante, e foram manipulados com pinça de titânio (Neodent[®]) (Figura 4.3), paramentação básica em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, SP, Brasil).

Figura 4.3 - Pinça de titânio- Neodent[®]

O implante foi acoplado no interior do dispositivo de acrílico, por meio da utilização da pinça de titânio – Neodent[®] esterilizada, que o abre e possibilita o posicionamento do implante em seu interior, sem contato algum do implante com outra superfície (Figura 4.4).

Figura 4.4 – Colocação do implante no interior do dispositivo acrílico. O implante retirado da embalagem original, utilizando a chave curta de instalação para contra-ângulo do sistema (A). O dispositivo aberto com a pinça de titânio- Neodent® (B). O implante sendo posicionado no interior do dispositivo (C). Posicionado no interior dispositivo acrílico (D)

Os implantes posicionados no interior do dispositivo foram colocados em placas de poliestireno de 12 poços contendo 1mL de DMEM com 15% SFB. O concentrado de células numa densidade de 5×10^4 células por poço em 1mL de DMEM com 15% SFB foram plaqueadas sobre o corpo dos respectivos implantes. Foram submetidas ao cultivo de 24, 48 e 72 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ (Figura 4.5).

Figura 4.5 - Os implantes posicionados na placa. Os implantes no interior do dispositivo colocado em placas de poliestireno de 12 poços contendo 1mL de DMEM com 15% SFB (A). As células plaqueadas sobre os respectivos implantes numa densidade celular de 5×10^4 células / poço (B). Os quatro implantes com as células plaqueadas submetidos ao cultivo (C)

O meio de cultura foi trocado ao completar 48 horas, com o intuito de mimetizar a solubilidade do tecido vivo, a substituição por meio fresco, sempre trocando apenas a metade (1mL) da quantidade total do meio.

4.3.2 Adesão celular

De forma representativa, a adesão celular nas superfícies dos implantes foi analisada por meio do MEV após 24 e 72 horas do plaqueamento e foi observado aumento original de 100x, 300x, 500x e 1000x.

Fixação das amostras: 1 amostra de todos os implantes para cada tempo de cultivo foi fixada por 2 horas em glutaraldeído a 2% em solução de cacodilato 0,1M e pH 7,2. Em seguida, foram lavadas três vezes em tampão de cacodilato sódio 0,1 M com a duração de 5 minutos cada lavagem. As amostras foram deixadas por 20 minutos em pós-fixador de tetróxido de ósmio 1%. Novamente foram submetidas a três lavagens em tampão de cacodilato 0,1 M com a duração de 5 minutos cada lavada.

Desidratação e secagem da amostra: a desidratação foi realizada por meio do processo sequencial em etanol de 30% até 100% e submetida à secagem por 20 minutos em hexamethyldisilane HMDS (Microscopia Eletrônica Sciences, Fort Washington, PA, EUA).

Revestimento com ouro: as amostras foram submetidas à pulverização catódica e revestidas com ouro (Sputtering SCD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein).

Posteriormente, as amostras foram fixadas nos *stubs* com fita de carbono dupla face e analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (Leo 430 SEM, Leo Ltda., Cambridge, UK), na ampliação de 100x, 300x, 500x e 1000.

A observação da adesão celular na superfície dos implantes foi entre a área de adesão celular em relação a mesma área do implante sem célula (Liu et al., 2013).

O estágio de adesão e espriamento celular foram avaliados em relação à morfologia das células, a saber: esféricas, filipódios, lamelipódios e espriadas em cada superfície e em cada tempo (Conserva et al., 2013).

4.3.3 Viabilidade celular e curva de crescimento

A viabilidade celular foi avaliada qualitativamente pela observação do crescimento no fundo da placa das células OSTEO-1 e ao redor das espiras dos implantes, monitorado diariamente em microscópio invertido de fase (Nikon TMS, Nikon, Melville, NY, EUA).

Os padrões de proliferação foram analisados quantitativamente utilizando os resultados da análise da atividade mitocondrial das células submetidas ao teste de redução do MTT (3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-yl; -2,5-difeniltetrazólio - Invitrogen/Gibco). Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em formazan insolúvel.

A solução de MTT (reagente A) foi preparada com 0,05g do pó de MTT dissolvido em 10 mL de PBS (pH 7,2; LGC Biotecnologia). Após os períodos de 24, 48 e 72h de cultivo, o meio de cultura foi removido e o conjunto implante e dispositivo acrílico foi transferido para o poço ao lado contendo adicionados 0,2mL da solução de MTT e 1,8mL de DMEM com 15% SFB (Figura 4.6).

Figura 4.6 - Reagente A (0,05g de pó de MTT dissolvido em 10mL de PBS). Após o período de cultivo o conjunto implante (A). Dispositivo acrílico foi transferido ao poço ao lado contendo adicionado 200µl da solução de MTT e 1800µl de DMEM com 15% SFB (B)

A placa de cultivo foi protegida com papel alumínio e mantida em estufa a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 4 horas. Após esse período, a placa foi levada para o microscópio invertido de fase para confirmar a formação dos cristais de formazan. Em seguida, a solução de MTT foi removida, foram adicionados 2mL por poço da solução de DMSO (Sigma Aldrich) e tampão glicina na proporção

de 4:1 (reagente B). Após a ressuspensão abundante do reagente B sobre os implantes, o formazan azul purpúrea foi solubilizado, e o conjunto dispositivo e implante foram removidos após 20 minutos em contato com este reagente. A concentração foi determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro Synergy HT BioTeK[®] (BioTeK[®], Instruments, Inc. Winooski, Vermont, EUA) com filtro de 562 nm (Figura 4.7).

Figura 4.7 - Reagente B (DMSO e tampão glicina 1:4). O formazan, de cor azul purpúrea, solubilizado sobre o conjunto dispositivo (A). Implante removido após 20 minutos (B)

Os dados foram utilizados para analisar a adesão celular (24h) e para obter as curvas de crescimento das células (24, 48 e 72h). Os experimentos foram realizados em triplicata (Klein et al., 2013). O desenho da placa e a quantidade de implantes utilizados na pesquisa estão ilustrados no quadro 4.1 e tabela 4.3.

BLANK	BLANK	BLANK	BLANK
Intra lock [®]	SIN [®]	Conexão [®] I	Conexão [®] II
(Teste MTT 24, 48, 72h)	(Teste MTT 24, 48, 72h)	(Teste MTT 24, 48, 72h)	(Teste MTT 24, 48, 72h)

Quadro 4.1- Modelo do posicionamento dos implantes em 01 placa de 12 poços

Tabela 4.3 - Quantidade de implantes utilizados no modelo experimental para comparar a influência dos tratamentos de superfície no processo de interação das células ósseas

Superfície comercialmente disponível	Caracterização da superfície (MEV)	Adesão celular (24 e 72h)	Viabilidade e crescimento celular			Piloto	Total
			(teste MTT) 24h	(teste MTT) 48h	(teste MTT) 72h		
Nano superfície ossean™ - Intra-lock® System International	1	2	3	3	3	6	18
Superfície ativada - SIN	1	2	3	3	3	16	28
Porous Conexão	1	2	3	3	3	11	23
Actives Vulcano Conexão	1	2	3	3	3	11	23

4.4 Análise estatística

Os dados do teste do MTT entre os diferentes tipos de tratamento de superfície e os tempos de cultivo foram comparados por ANOVA complementado pelo teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização qualitativa dos tratamentos de superfície

Eletronmicrografias da topografia da superfície dos quatro tipos de implantes estão apresentadas na figura 5.1. No aumento original de 10x todos os implantes mostraram distribuição homogênea do tratamento de superfície. No aumento original de 500x foi observada diferença entre as microestruturas dos diferentes tratamentos de superfície. A superfície A (jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP) exibiu microcavidades induzidas pelo processo de jateamento que foram suavizadas pelo processo de condicionamento ácido, resultando numa microestrutura uniforme ao longo de todo o parafuso. Em B e C (duplo condicionamento ácido e condicionamento ácido) observa-se superfície áspera, com diferentes morfologias dos micro-orifícios entre elas. A superfície D (oxidação anódica) apresentou poros em toda a superfície.

Figura 5.1 - Eletronmicrografia da caracterização qualitativa dos quatro implantes testados. Jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP (A). Duplo condicionamento ácido (B). Condicionamento ácido (C). Oxidação Anódica (D). Aumento original de 10x (1); Aumento original de 300x (2)

5.2 Avaliação qualitativa da adesão, viabilidade e crescimento celular

5.2.1 Adesão celular

Utilizando o microscópio eletrônico de varredura (MEV), diferenças na morfologia das células OSTEO-1 foram encontradas após o cultivo nas diferentes superfícies, como estão apresentadas nas figuras 5.2 e 5.3. Após 24h de crescimento, em contato com a superfície A, as células OSTEO-1 estavam globulares e exibiram numerosos filipódios para o interior da rugosidade da superfície, com presença de mitose celular ao longo da superfície e notou-se maior quantidade de células aderidas em relação as outras superfícies (Figura 5.4).

Observou-se semelhança na morfologia das células OSTEO-1, aderidas na superfície B e C, achatadas com filipódios longos e finos. Já na superfície D, após 24h, observou-se que as células estavam bastante alongadas com filipódios longos e finos.

Em 72 horas foi observado aumento do número de células em todas as superfícies, com discreto aumento da quantidade de células aderidas na superfície A em relação às demais. Todas as células estavam em estágio de espraiamento, porém não atingiram confluência, sendo observadas áreas da superfície que não foram completamente cobertas por células em todos os implantes. Notou-se que a morfologia das monocamadas das células aderidas nas superfícies B, C e D estavam mais espessas quando comparadas com a superfície A (Figuras 5.5 e 5.6).

Figura 5.2 - Eletronmicrografia da adesão celular em 24 horas nos quatro implantes testados. Jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP (A). Duplo condicionamento ácido (B). Condicionamento ácido (C). Oxidação Anódica (D). Aumento original de 100x (1); Aumento original de 300x (2)

Figura 5.3 - Eletronmicrografia da adesão celular em 24 horas nos quatro implantes testados. Jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP (A). Duplo condicionamento ácido (B). Condicionamento ácido (C). Oxidação Anódica (D). Aumento original de 500x (1); Aumento original de 1000x (2)

Figura 5.4 - Eletronmicrografia da mitose celular OSTEO-1 na superfície com jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP (24h). (Aumento original de 2000x)

Figura 5.5 - Eletronmicrografia da adesão celular em 72 horas nos quatro implantes testados. Jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP (A). Duplo condicionamento ácido (B). Condicionamento ácido (C). Oxidação Anódica (D). Aumento original de 100x (1); Aumento original de 300x (2)

Figura 5.6 - Eletronmicrografia da adesão celular em 72 horas nos quatro implantes testados. Jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP (A). Duplo condicionamento ácido (B). Condicionamento ácido (C). Oxidação Anódica (D). Aumento original de 500x (1); Aumento original de 1000x (2)

5.2.2 Viabilidade celular

Todos os implantes dentários testados, independentemente do tratamento de superfície, não apresentaram características de citotoxicidade para as células OSTEO-1, observado também que as células cresceram no fundo da placa de cultivo ao redor dos implantes com ausência do halo de inibição após o monitoramento diário pelo microscópio invertido de fase (Figura 5.7).

Figura 5.7 – Eletronmicrografia de células OSTEO-1 crescidas no fundo da placa de cultivo ao redor dos implantes. Observe a ausência de halo de inibição do crescimento celular em microscópio invertido de fase no cultivo de 24, 48 e 72h. Jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP (A). Duplo condicionamento ácido (B). Condicionamento ácido (C). Oxidação Anódica (D). Monitorado em 24 (1), 48 (2) e 72 (3) horas de cultivo (Aumento original 10x).

5.3 Avaliação quantitativa da adesão, viabilidade e crescimento celular

Após as 72h de incubação, não houve sinais de citotoxicidade pelo teste de redução do MTT em nenhuma amostra. Na avaliação de 24 e 48h não houve diferença estatística da adesão, viabilidade e crescimento celular entre nenhum dos quatro tipos de tratamento de superfície testados ($p = 0,216$), demonstrando semelhanças de biocompatibilidade e promoção de viabilidade celular nos implantes estudados. Já no cultivo celular de 72h vê-se um menor crescimento celular na superfície tratada com duplo condicionamento ácido (B) em relação aos demais tratamentos testados. Há uma tendência de melhor desempenho de crescimento celular na superfície A em relação às superfícies C e D, mas sem diferenças matemáticas entre elas. Apesar disso, todos os quatro tipos de superfície de implantes testados tiveram aumento do MTT no decorrer dos três momentos de análise do estudo, se avaliados individualmente, corroborando a ideia da viabilidade das superfícies de liga de titânio na promoção de adesão, viabilidade e crescimento de células OSTEO-1 (Figura 5.8).

DO- Densidade óptica; h- horas; Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no tempo de 72 horas ($p < 0,05$)

Figura 5.8 – Gráfico da diferença significativa dos dados da densidade óptica da interação das células OSTEO-1 com as diferentes características físico-químicas dos tratamentos de superfícies dos quatro implantes dentários em relação à viabilidade celular, adesão (24h) e crescimento celular (48 e 72h).

6 DISCUSSÃO

Desde a década de 1980 até os dias atuais são encontrados estudos sobre a influência das características físico-químicas dos tratamentos de superfície dos implantes dentários, ou seja, rugosidade, composição química no processo da osteointegração (Albrektsson et al., 1981; Wang et al., 2014). Comparamos os tratamentos de superfície com modificação da composição química e da rugosidade da superfície dos implantes dentários. Na literatura foi encontrado o triplo da quantidade de artigos científicos relacionados a estudos *in vitro* que apresentaram modificação da composição química da superfície dos implantes dentários, em relação aos que apresentaram apenas alteração da rugosidade da superfície.

Em relação à rugosidade dos tratamentos de superfície foi observado que no geral os estudos têm apresentado as medidas da rugosidade, desde o início da década de 1990 (Wennerberg; Albrektsson, 2000; Wennerberg; Albrektsson, 2009). Infelizmente, a minoria dos artigos caracterizou a rugosidade da superfície dos implantes. Na realidade, observou-se que até mesmo a superfície polida variou consideravelmente os valores da rugosidade (Daw et al., 2013; Calzado-Mart et al., 2014). A caracterização qualitativa da topografia dos tratamentos de superfície aqui estudados mostrou, por meio do microscópio eletrônico de varredura, que as duas superfícies modificadas por condicionamento ácido (B e C) apresentaram diferença na topografia. De fato, a microestrutura é estritamente dependente da concentração das soluções e do tempo de exposição a que foram submetidas por cada fabricante, evidenciando, assim, a importância da mensuração da rugosidade dos tratamentos de superfície dos implantes.

No entanto, quando a rugosidade é descrita, apenas os parâmetros bidimensionais da altura do perfil da rugosidade (Ra) ou parâmetros tridimensionais da altura da superfície (Sa) foram mencionados (Daw et al., 2013; Calzado-Mart et al., 2014; Lai et al., 2014). Porém, a boa descrição da rugosidade da superfície deve incluir a altura, bem como Sds (mm), que é a densidade, e a Sdr (%), que é o parâmetro híbrido (Wennerberg; Albrektsson, 2009).

No presente estudo não foi realizada a caracterização da rugosidade dos tratamentos de superfícies, porém esta foi descrita em estudos anteriores, com a mensuração adequada de todos os parâmetros e, por isso, utilizamos estes dados

da literatura para explicar nossos resultados (Rosa et al., 2013; Zambuzzi et al., 2014). A microtopografia e a nanotopografia do tratamento de superfície por jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP foi caracterizado no estudo de Bucci-Sabattini et al. (2010) e posteriormente confirmada no estudos de Zambuzzi et al. (2014).

Nos estudos comparativos *in vitro* de tratamento de superfície comercialmente disponível, a característica mais uniforme da rugosidade de superfície por duplo condicionamento ácido, jateamento e condicionamento ácido foi responsável pela maior taxa de adesão celular (Liu et al., 2013). De forma semelhante, tal resultado foi encontrado em nosso estudo, onde a topografia mais uniforme do tratamento de superfície com jateamento, condicionamento ácido e revestimento de CaP obteve melhor resultado em relação a adesão e crescimento celular.

Rosa et al. (2013) observaram em seu estudo comparativo entre a rugosidade do tratamento de superfície comercialmente disponível de empresas brasileiras com produtos importados, rugosidade mais baixa em relação aos implantes de referência e diferenças estatisticamente significativas da rugosidade da superfície entre os lotes dos implantes de todas as empresas nacionais estudadas. Esse dado pode ser corroborado com os nossos resultados, em que a adesão e o crescimento celular, nos tratamentos de superfície das empresas nacionais, não sobressairam aos resultados em relação ao tratamento de superfície da empresa americana.

A utilização do implante em formato de parafuso é o protótipo de estudo que mais se aproxima da aplicação clínica, porém poucos artigos utilizaram o implante para realizar as análises (Conserva et al., 2013; Liu et al., 2013), com a maioria deles utilizando discos de titânio. Foram encontrados diferentes valores da rugosidade da superfície no disco (Klein et al., 2013) comparada com descrição da rugosidade do mesmo tratamento de superfície no implante em formato de parafuso (Liu et al., 2013), sugerindo que o tratamento de superfície resultante no disco pode não ter as mesmas características físico-químicas da superfície no implante.

Vários tipos de estudos científicos têm sido utilizados para avaliar a interação óssea com as diferentes características dos tratamentos de superfície dos implantes (Wennerberg; Albrektsson, 2010). Os estudos *in vitro* são amplamente utilizados, sendo encontrados na literatura em número duas vezes maior que os artigos com metodologia *in vivo*. Porém, pouco se sabe sobre qual é o perfil e o impacto clínico dos estudos *in vitro* ao estabelecer evidências sobre a influência das características

físico-químicas da superfície no processo de osteointegração. Os resultados têm sido confirmados e aprimorados ao longo dos anos de estudo sobre o assunto, em relação aos estudos de maior força de evidência, tanto clínicos quanto *in vivo*. As certezas estão limitadas à influência da rugosidade da superfície na escala micrométrica em relação ao maior valor do torque de remoção do implante e contato osso-implante (Albrektsson; Wennerberg, 2004; Wennerberg; Albrektsson, 2009; Wennerberg; Albrektsson, 2010).

Encontramos dificuldade em realizar esta análise, pois os estudos visam à comparação entre os diversos tipos de tratamentos e não entre a modificação da rugosidade resultante. Mesmo assim, observou-se que em tratamentos que resultaram no aumento da rugosidade na escala micrométrica (Li et al., 2013; Liu et al., 2013; Chen et al., 2014; Zhuang et al., 2014) e submicrométrica (Zuo et al., 2013; Calzado-Mart et al., 2014; Kawase et al., 2014; Tan et al., 2014) foram obtidos melhores resultados em relação a adesão, proliferação e diferenciação celular. Da mesma forma, observou-se um sinergismo de resultados entre as modificações superficiais na escala micrométrica e submicrométrica (Daw et al., 2013; Klein et al., 2013) e na escala micrométrica e nanométrica (Lai et al., 2014; Zambuzzi et al., 2014). Nossos resultados corroboram indiretamente este conhecimento, pois o sinergismo da modificação da rugosidade da superfície na escala micrométrica e nanométrica resultante do tratamento por jateamento, condicionamento ácido e revestimento de CaP resultou em maior crescimento celular, estatisticamente significativo em relação a modificação da rugosidade da superfície em nível micrométrico, resultante do tratamento de superfície dos demais implantes estudados.

Grande número de estudos clínico e *in vivo* têm demonstrado que a resposta óssea é influenciada pela rugosidade da superfície do implante. As superfícies lisas ($Sa < 0,5 \mu m$) e minimamente rugosas ($Sa 0,5-1 \mu m$) resultaram em menor contato osso-implante em relação às superfícies rugosas. Contudo, as moderadamente rugosas ($Sa 1-2 \mu m$) resultaram em aumento do contato ósseo com a superfície dos implantes em relação às superfícies rugosas ($Sa > 2 \mu m$) (Wennerberg; Albrektsson, 2009).

Nos estudos *in vitro* não foi possível estabelecer essa relação, pois houve adequada interação celular com a superfície lisa (Oliveira et al., 2014; Tan et al., 2014; Uchiyama et al., 2014), assim como foi relatado melhor resultado para as

superfícies moderadamente rugosas (Klein et al., 2013; Liu et al., 2013; Chen et al., 2014; Zambuzzi et al., 2014; Zhuang et al., 2014). Esse fato também converge com os dados encontrados acerca da adesão e crescimento celular, segundo os quais as superfícies moderadamente rugosas, dos tratamentos por jateamento, condicionamento ácido e revestimento de cálcio e fosfato e oxidação anódica, foram semelhantes aos dados da superfície minimamente rugosa por condicionamento ácido.

Além da influência da rugosidade da superfície dos implantes dentários na escala micrométrica estabelecida nos estudos clínicos e *in vivo*, existem também algumas indicações de que as respostas ósseas são influenciadas pela alteração da superfície em nível nanométrico (Wennerberg; Albrektsson, 2010). De acordo com Webster et al. (2005), a rugosidade da superfície pode ser mensurada nas escalas macrométricas em milímetros (mm), micrométricas em micrômetros (μm), submicrométricas acima de 100-150 nanômetros (nm) e inferiores a $1\mu\text{m}$ e nanométrica (1 a 100 nm). Não foi possível estabelecer a importância na nanotopografia nos estudos *in vitro*, pois foi encontrado erro em relação a essa classificação em cinco artigos, cujos títulos mencionaram modificação nanométrica, porém o resultado encontrado se dava em nível submicrométrico (Daw et al., 2013; Zuo et al., 2013; Li et al., 2014; Tan et al., 2014; Zhuang et al., 2014).

A interpretação das modificações das superfícies é complexa, em virtude de que, após alterar a microtopografia, a nanotopografia da mesma superfície também sofre mudanças, mesmo não planejadas (Wennerberg; Albrektsson, 2009). Assim, todas as alterações da superfície podem resultar em modificações nanométricas. Entretanto, para afirmar a presença da nanotopografia ela deve ser confeccionada de propósito, estar distribuída uniformemente e ser caracterizada adequadamente (Rosei, 2004; Kawase et al., 2014; Tan et al., 2014; Zambuzzi et al., 2014).

Em relação ao tipo de tratamento, a maioria dos estudos contemplados intentava confeccionar superfícies experimentais ou protótipos de estudo, que podem se tornar tratamentos de superfície promissores, mas distantes da aplicação clínica, como: polimento (Calzado-Mart et al., 2014), jateamento (Zuo et al., 2013; Kawase et al., 2014), condicionamento ácido e/ou alcalino (Daw et al., 2013; Pivodova et al., 2013; Chen et al., 2014; Oliveira et al., 2014; Tan et al., 2014; Zhuang et al., 2014), jateamento e condicionamento ácido (Pivodova et al., 2013; Chen et al., 2014), oxidação anódica (Kim et al., 2013; Chen et al., 2014; Li et al., 2014), laser de Nd:YAG (ítrio-alumínio dopado com neodímio) (Wang et al., 2014),

oxidação anódica com irradiação de UVC (ultravioleta C) ou UVA (ultravioleta A) (Gao et al., 2013), condicionamento ácido com irradiação de UVC (Uchiyama et al., 2014), jateamento e condicionamento ácido com laser KrF (Györgyey et al., 2013) e com laser Er:YAG (ítrio-alumínio dopado com érbio) (Ayobian-Markazi et al., 2013).

Poucos artigos utilizaram superfícies comercialmente disponíveis, como jateamento e condicionamento ácido das empresas Intra-Lock® (Zambuzzi et al., 2014); Straumann® (Klein et al., 2013; Lai et al., 2014); Friadent (Perroti et al., 2013). E apenas dois artigos compararam os diferentes tratamentos de superfícies comercialmente disponíveis, como jateamento e condicionamento ácido, duplo condicionamento ácido e oxidação anódica (Conserva et al., 2013; Liu et al., 2013). O presente estudo, de acordo com a revista de literatura, foi o único a comparar a interação óssea entre quatro tipos de tratamentos de superfície comercialmente disponível, dos quais três são fabricados no Brasil.

Não só a rugosidade como também a composição química da superfície dos implantes dentários são estudados. Grande número de artigos foi encontrado relacionado à modificação química da superfície como revestimento de BMP (proteína óssea morfogenética), fator de crescimento, laminina, cálcio, fosfato e/ou outros íons. Alguns desses estudos, que apresentaram tratamento de superfície com condicionamento alcalino e irradiações com ultravioleta, não foram capazes de alterar a rugosidade, no entanto, foram capazes de modificar o comportamento biológico da superfície (Gao et al., 2013; Uchiyama et al., 2014). Tal observação pode ser explicada pelo aumento da hidrofiliabilidade e pela atuação no processo de limpeza dessas superfícies (Pivodova et al., 2013).

A composição química das superfícies estudadas podem ter influenciado os nossos resultados, pois de acordo com Anselme et al. (2010) a adesão celular em curto prazo é mais influenciada pela composição química da superfície. Já, em longo prazo, têm sido correlacionados com topografia, parâmetros híbridos da rugosidade. No presente estudo também não foi avaliada a afinidade das superfícies com a água, que é relacionada com a composição química do tratamento de superfície. A Figura 5.8 mostra, no tempo de 72h, um pior desempenho do crescimento celular na superfície com duplo condicionamento ácido (B) que as demais superfícies testadas, o que poderia ser explicado pela diferença na afinidade da superfície com a água, porém tal teste de ângulo de contato não foi realizado nesta etapa da pesquisa, sugerindo a necessidade de mais estudos utilizando os mesmos tratamentos de

superfície com a completa caracterização da superfície do implante, incluindo todos os parâmetros da rugosidade, o ângulo de contato e a composição química. Além disso, a avaliação da diferenciação celular por um tempo mais prolongado se torna necessário para responder totalmente sobre a influência da composição química e energia da superfície nos nossos resultados.

As características físico-químicas das nanopartículas têm a capacidade de induzir a diferenciação de células mesenquimais (Bressan et al., 2013). O efeito do revestimento de CaP sobre a osteogênese tem sido estudado e foi observado aumento da expressão gênica, do depósito de cálcio, três vezes mais sobre a superfície com CaP do que em relação a outro substrato, com ligeira tendência ao aumento do torque de remoção do implante em tíbias de coelho, características biológicas que podem ser utilizadas para otimizar revestimentos dos tratamentos de superfície dos implantes dentários (He et al., 2013).

Nos estudos com tratamentos de superfície comercialmente disponíveis, a associação de processos subtrativos com revestimento de cálcio e fosfato alterou a rugosidade em nível nanométrico; no entanto, não foram capazes de modificar o comportamento biológico da superfície em comparação a outros tipos de tratamento de superfície (Bucci-Sabattini et al., 2010; Liu et al., 2013; Zambuzzi et al., 2014). Tal achado corrobora nosso resultado, onde os dados de adesão e crescimento celular na superfície modificada por jateamento e condicionamento ácido com revestimento de cálcio e fosfato foram semelhantes aos dados das outras superfícies até 48h após o início do cultivo celular. Há relato de diferença estatisticamente significativa do crescimento celular apenas após 72 horas no grupo com o tratamento de superfície por duplo condicionamento ácido, o que indiretamente demonstra a importância das nanopartículas de CaP neste desempenho. Mas a principal explicação para os resultados pobres do grupo B passa pela conclusão de Rosa et al. (2013), onde afirmaram que a superfície com duplo condicionamento ácido tem menores valores de Sds e Sdr, ou seja, menor proporção de rugosidade por mm^2 e menor porcentagem de rugosidade em relação à superfície lisa que os demais implantes por eles estudados.

Assim, conclui-se que uma superfície de implante com rugosidade pobre e não uniforme determina menor viabilidade celular, independente do processo aplicado, além de se levar em conta também sua reatividade química, também fruto dos processos de tratamento. O tipo de tratamento de superfície do implante

influencia os parâmetros físicos e químicos de maneira interdependente e isso influi sobremaneira no desempenho clínico do produto. As características da superfície dos implantes foram capazes de influenciar outras células, tais como queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, de forma diferente que a célula óssea, como também as características do tratamento de superfície dos implantes são capazes de influenciar a adesão e proliferação de bactérias. Os estudos relatados são importantes para a manutenção dos implantes após o período de osseointegração (Anselme et al., 2010).

Além da dificuldade encontrada na caracterização do tratamento de superfície, no implante em formato de parafuso também encontramos dificuldade no momento de realizar o cultivo celular quando se trata de osseointegração *in vitro*. Alguns estudos, que utilizaram o implante como protótipo de estudo, realizaram o cultivo em meio de cultura semissólido (Conserva et al., 2013; Liu et al., 2013). No nosso estudo, apresentamos uma alternativa simples e prática para o estudo *in vitro*, utilizando o implante em formato de parafuso com meio líquido de cultura, por meio de um dispositivo acrílico biocompatível, que possibilitou a imobilização do parafuso no interior da placa para assim realizar as análises.

Vários tipos celulares foram utilizados para avaliação da interação celular nos diversos tipos de tratamentos das superfícies: célula mesenquimal humana (Perroti et al., 2013; Calzado-Mart et al., 2014); célula mesenquimal de rato (Chen et al., 2014; Tan et al., 2014); osteoblasto humano (Oliveira et al., 2014); células imortalizadas da calvária de ratos MC3T3-E1 (Kim et al., 2013; Zuo et al., 2013; Li et al., 2014; Wang et al., 2014; Zambuzzi et al., 2014; Zhuang et al., 2014); células extraídas do fêmur de ratos Wistar (Daw et al., 2013); células extraídas do fêmur de ratos Sprague-Dawley (Uchiyama et al., 2014) e células extraídas do osso alveolar da mandíbula de ratos Wistar (Liu et al., 2013). O fenótipo celular é um ponto importante a ser considerado quando da seleção do tipo celular no estudo de interação celular na superfície.

Nas linhagens de células primárias, o fenótipo é muito próximo das células do tecido original, mas em geral são difíceis de cultivar *in vitro*. As linhagens de células permanentes são extraídas pela imortalização de células primárias ou são derivadas de tumores ósseos. A principal vantagem dessas células é a alta capacidade de proliferação, mas o fenótipo pode ser ligeiramente diferente do tecido original (Anselme et al., 2010). As cepas, cultivadas em laboratório e comercializadas, têm a

possibilidade da padronização das células nos estudos *in vitro*. No entanto, as células mesenquimais foram consideradas mais sensíveis que os osteoblastos na liga Ti6Al4V com tratamento de superfície (Calzado-Mart et al., 2014).

Duas linhagens celulares de osteossarcoma humano são frequentemente utilizadas e foram os tipos celulares predominantes entre os estudos para analisar a influência da rugosidade da superfície em modelo de osteointegração *in vitro*: Saos-2 e MG63 (Ayobian-Markazi et al., 2013; Gao et al., 2013; Györgyey et al., 2013; Klein et al., 2013; Pivodova et al., 2013; Kawase et al., 2014; Lai et al., 2014;). Estudos mostram que na linhagem de osteossarcoma humano ocorreu a deformação do núcleo, fato não observado em células mesenquimais. Essa deformação nuclear pode propiciar resultados anormais na diferenciação celular nessas linhagens. Esses resultados indicam que linhagem de células de osteossarcoma humano não deve ser utilizada para o estudo da interação celular com os tratamentos de superfície (Anselme et al., 2010). Este estudo utilizou a linhagem permanente de células de calvária de ratos Wistar recém-nascidos (Deboni et al., 1996). Contudo, os resultados dos estudos de Anselme et al. (2010) e Calzado - Mart et al. (2014) sugerem que a célula mesenquimal humana é o tipo celular ideal para nosso modelo de estudo. Neste ponto sobressai uma dúvida de que essas células diferenciadas e não derivadas de tumores possuam mecanismos intactos de apoptose e crescimento menos expressivos, com poder de confluência menor, o que poderia explicar o menor crescimento celular na superfície B com 72h de tempo de cultivo. Tal dúvida só poderia ser aclarada com um estudo que contemple maior tempo de cultivo celular e compare linhagens celulares de diferentes origens.

As células aderentes são oriundas de tecidos duros e, por isso, são dependentes de ancoragem, ou seja, necessitam de adesão a uma superfície de contato para que possam iniciar a proliferação. Para as células aderentes, a superfície de titânio modificada deve possuir carga negativa, que medeia a produção de proteínas de adesão e proteoglicanos que iniciarão o processo de adesão da célula à superfície. É a matriz extracelular que interage com a carga negativa da superfície e, então, as células ligam-se à matriz por receptores específicos (Anselme et al., 2010). A MEV e os ensaios de imunofluorescência foram os métodos mais utilizados para avaliar a adesão celular nos tratamentos de superfície (Gao et al., 2013; Daw et al., 2013; Györgyey et al., 2013; Klein et al., 2013; Kim et al., 2013; Liu et al., 2013; Pivodova et al., 2013; Perroti et al., 2013; Zuo et al., 2013; Calzado-Mart

et al., 2014; Lai et al., 2014; Chen et al., 2014; Li et al., 2014; Kawase et al., 2014; Tan et al., 2014; Wang et al., 2014; Zhuang et al., 2014).

A observação da morfologia celular correspondeu com a taxa de crescimento celular em contato com os tratamentos de superfície (Conserva et al., 2013; Liu et al., 2013). Esse fato foi em direção aos nossos resultados, em que a observação das células OSTEO-1 mais globulares, com numerosos filipódios para o interior da rugosidade da superfície, e com presença de mitose celular, correspondeu com o maior crescimento celular no tratamento de superfície com jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP. Em contrapartida, a observação do corpo mais achatado das células OSTEO-1, com filipódios longos, finos e formação de monocamada delgada correspondeu com o menor crescimento celular do tratamento de superfície por duplo condicionamento.

A quantificação é utilizada para definir a viabilidade celular e as condições de crescimento. Existem duas maneiras de quantificar células em cultura, a saber, na forma direta e indireta. O método menos utilizado é pela forma indireta (Zuo et al., 2013). Vários tipos de testes foram utilizados, como: *Alamar Blue*, convertido na forma reduzida pelas enzimas mitocondriais, a detecção da redução é colorimétrica e fluororimétrica (Györgyey et al., 2013; Calzado-Mart et al., 2014) e testes XTT que avaliam a atividade mitocondrial (Zambuzzi et al., 2014). Entre os métodos de contagem indireta, o teste de brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), baseado na redução do MTT, foi o que utilizamos para avaliar viabilidade e crescimento celular e, por conseguinte, o mais utilizado entre os estudos *in vitro* (Ayobian-Markazi et al., 2013; Gao et al., 2013; Györgyey et al., 2013; Daw et al., 2013; Kim et al., 2013; Pivodova et al., 2013; Li et al., 2014; Uchiyama et al., 2014). O teste do MTT mede a respiração celular, que é proporcional à quantidade de Formazan produzida e ao número de células viáveis em cultura. A vantagem desse método, em relação ao teste XTT, é que possui solubilidade diferente, enquanto o teste do MTT tem contagem do metabolismo celular mais eficiente. Em relação ao teste *Alamar Blue*, em alguns estudos com tratamentos de superfície pode haver reatividade cruzada do teste com substratos testados (Mosmann, 1983; Nakayanna et al., 1997).

A resposta celular mais importante e particular dos estudos *in vitro* frente às modificações da superfície dos implantes é a diferenciação celular. Várias tentativas foram feitas para buscar elucidar os mecanismos das respostas celulares em relação

à rugosidade da superfície de titânio utilizando variados testes, como: atividade da fosfatase alcalina, proteína total, vermelho de Alizarina PCR, Elisa, Western Blot. Conseguiram concluir que as integrinas $\alpha 2\beta 1$ e TNF $\alpha 2$ estão envolvidas na resposta celular com os tratamentos de superfícies com rugosidade diferente (Pivodova et al., 2013; Lai et al., 2014), como também as vias de sinalização FAK (Zambuzzi et al., 2014) e ROCK (Calzado-Mart et al., 2014), os marcadores ósseos RUNX1, BGLAP e a expressão gênica SP7 (Perroti et al., 2013), a fosfatase alcalina (Györgyey et al., 2013), o conteúdo de proteína total (Zhuang et al., 2014) e a formação de matriz mineralizada (Chen et al., 2014). Porém, diferentes tratamentos de superfícies experimentais e a utilização de diferentes linhas celulares inviabilizaram a comparação dos resultados obtidos.

Dentre os tratamentos de superfície comercialmente disponíveis, a taxa de crescimento celular teve correspondência com a formação de fosfatase alcalina nos estudos comparativos *in vitro* sobre a influência das modificações da superfície nos modelos de osteointegração (Conserva et al., 2013). No nosso estudo não foi avaliada a diferenciação celular. No entanto, o resultado da diferenciação celular nas superfícies estudadas, utilizando células mesenquimais em modelo de osseointegração *in vitro* com a complementação em estudo *in vivo* terá valor científico para o entendimento da influência das características físico-químicas dos tratamentos de superfície no processo de osseointegração. Vale ressaltar que o tratamento de superfície dos implantes é apenas um dos requisitos para a osseointegração e que novas tecnologias dos tratamentos de superfície auxiliam na resolução de alguns casos, principalmente em que o tempo curto para colocação de carga é uma necessidade do paciente e nos casos em que há o comprometimento do metabolismo ósseo, local ou sistêmico. Contudo, não substituem uma avaliação individualizada do caso, adequada avaliação do leito ósseo receptor, a seleção do desenho do implante e a técnica cirúrgica adequada para atingir a estabilidade primária.

Cultura de célula é um modelo de função fisiológica muito contraditória, devido a perda de características que ocorre durante o desenvolvimento em cultura. A adesão celular, célula-célula e célula-matriz são reduzidas e não possuem as características (heterogeneidade e arquitetura tridimensional) de um tecido *in vivo*, uma vez que seu meio nutricional e hormonal está modificado. A proliferação *in vitro* difere daquela *in vivo*. O estudo *in vitro* envolve um único tipo celular, e a

osseointegração é efeito de combinação de células e citocinas. Apesar disso, ainda existem muitas vantagens no uso de cultura de células como modelo experimental. O controle do ambiente, a homogeneidade da amostra quando comparada ao uso de animais em experimentos, ausência da aprovação das Comissões de Ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) para células já extraídas e o baixo custo são as principais vantagens dessa técnica. Atualmente no Brasil, com a limitação do uso de animais em testes laboratoriais, tornou-se o principal modelo alternativo para a substituição destes em experimentos de pesquisa. Apenas no estudo *in vitro* é possível obter melhor compreensão da resposta celular e molecular, resultados que são de grande valor para melhorar a superfície dos implantes, nortear o estudo *in vivo* e projetar a melhoria da osteointegração. Para maior entendimento sobre a influência das características físico-químicas dos tratamentos de superfície nos modelos de osteointegração por meio dos estudos *in vitro* e, ainda, para obtermos resultados que alicercem um melhor entendimento, são necessários e devem ser aprimorados os estudos que utilizem tratamento de superfícies comercialmente disponível, com o implante em formato de parafuso como protótipo de estudo. Além disso, tais pesquisas devem visar a adequada caracterização da rugosidade com parâmetro descritivo da altura, espacial e híbrido, a medição da reatividade da superfície, bem como a padronização do tipo celular e dos métodos de avaliação celular.

7 CONCLUSÃO

Frente aos resultados do estudo comparativo *in vitro* da influência dos tratamentos de superfície de quatro tipos de implantes dentários disponíveis comercialmente no Brasil, no processo de interação com as células ósseas, podemos concluir que:

- 1- Existem diferenças entre as microestruturas dos diferentes tratamentos de superfície. A superfície modificada por jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP apresentou a topografia mais uniforme.
- 2- Nenhum dos implantes dentários testados é citotóxico para os OSTEO-1 e todos suportaram a adesão celular. As características físico-químicas resultantes do tipo de tratamento de superfície dos implantes dentários testados influenciaram o crescimento celular. A superfície modificada por jateamento e condicionamento ácido com revestimento de CaP promoveu maior crescimento celular.

REFERÊNCIAS¹

Abraham CM. A Brief Historical Perspective on Dental Implants, Their Surface Coatings and Treatments. *Open Dent J*. 2014 May 16;8:50-5.

Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981;52(2):155-70.

Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: part 1 – review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont*. 2004 Sep-Oct;17(5):536-43.

Albrektsson T, Wennerberg A. The impact of oral implants- Past and future, 1966-2042. *J J Can Dent Assoc*. 2005 May;71(5):327.

Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. 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.

Anselme K, Ponche A, Bigerelle M. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: biological aspects. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010 Dec;224(12):1487-507.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Ayobian-Markazi N, Karimi M, Safar-Hajhosseini A. Effects of Er: YAG laser irradiation on wettability, surface roughness, and biocompatibility of SLA titanium surfaces: an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2013 Jun 13. [Epub ahead of print]

Bang SM, Moon HJ, Kwon YD, Yoo JY, Pae A, Kwon IK. Osteoblastic and osteoclastic differentiation on SLA and hydrophilic modified SLA titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2014 Jul;25(7):831-7.

Bianchi B, Ferri A, Ferrari S, Leporati M, Copelli C, Ferri T, Sesenna E. Mandibular resection and reconstruction in the management of extensive ameloblastoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Mar;71(3):528-37.

Block MS, Kent JN. Factors associated with soft and hard tissue compromise os endosseous implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 1990 Nov;48(11):1153-60.

Bressan E, Sbricoli L, Guazzo R, Tocco I, Roman M, Vindigni V, et al. Nanostructured Surfaces of Dental Implants. *Int J Mol Sci.* 2013 Jan 17;14(1):1918-31.

Boyan BD, Lossdorfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann CH, Cochran DL, et al. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur Cell Mater.* 2003 Oct 24;6:22-7.

Bucci-Sabattini V, Cassinelli C, Coelho PG, Minnici A, Trani A, Dohan Ehrenfest DM. Effect of titanium implant surface nanoroughness and calcium phosphate low impregnation on bone cell activity in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Feb;109(2):217-24.

Calzado-Mart A, Crespo L, Saldaña L, Boré A, Gómez-Barrena E, Vilaboa N. Human bone-lineage cell responses to anisotropic Ti6Al4V surfaces are dependent on their maturation state. *J Biomed Mater Res A*. 2014 Sep;102(9):3154-66.

Canabarro A, Diniz MG, Paciornik S, Carvalho L, Sampaio EM, Beloti MM, et al. High concentration of residual aluminum oxide on titanium surface inhibits extracellular matrix mineralization. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Dec 1;87(3):588-97.

Chen WC, Chen, YS, Ko CL, Lin Y, Kuo TH, Kuo HN. Interaction of progenitor bone cells with different surface modifications of titanium implant. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014 Apr 1;37:305-13.

Ciotti DN, Joly JC, da Silva RC, Cury PR. Characteristics of implant surface and implant-abutment micro gap in two-stage system. *Revista Implantnews* 2007;4(3):263-9.

Cochran D, Buser D, ten Bruggenkate C, Weingart D, Taylor T, Bernard J, et al. The use of reduced healing times on ITI implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface: early results from clinical trials on ITI SLA implants. *Clin Oral Implants Res*. 2002 Apr;13(2):144-53.

Conserva E, Menini M, Ravera G, Pera P. The role of surface implant treatments on the biological behavior of SaOS-2 osteoblast-like cells. An in vitro comparative study. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Aug;24(8):880-9.

Costa CA, Sena LA, Pinto M, Muller CA, Cavalcanti JHL, Soares GA. *In Vivo* Characterization of Titanium Implants Coated with Synthetic Hydroxyapatite by Electrophoresis. *Braz Dent J*. 2005;16(1):75-81.

Daw AE, Kazi HA, Colombo JS, Rowe W G, Williams DW, Waddington RJ, et al. Differential cellular and microbial responses to nano-/micron-scale titanium surface roughness induced by hydrogen peroxide treatment. *J Biomater Appl*. 2013 Jul;28(1):144-60.

Deboni MC, Jaeger MM, Araujo NSde. Obtenção e Caracterização de linhagem de células osteoblásticas. *RPG. Revista de Pós-Graduação (USP)*. 1996;3:220-229.

De Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials*. 2004 Feb;25(3):403-13.

Di Iorio D, Traini T, Degidi M, Caputi S, Neugebauer J, Piattelli A. Quantitative evaluation of the fibrin clot extension on different implant surfaces: an in vitro study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Jul;74(1):636-42.

Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Inventor Medical prosthetic devices having improved biocompatibility Patent US20080269910; 2008.

Ferguson SJ, Brogini N, Wieland M, de Wild M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, et al. Biomechanical evaluation of the interfacial strength of a chemically modified sandblasted and acid-etched titanium surface. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Aug;78(2):291-7.

Freshney, RI. Culture of animal cells. A Manual of Basic Techniques. 6.ed. Wiley Liss: Hoboken; 2010.

Forrest J, Miller A. Enhancing your practice through evidence-based decision making: finding the best clinical evidence. *J Evid Base Dent Pract* 2001;1: 227-36.

Fujita S, Ohshima M, Iwata H. Time-lapse observation of cell alignment on nanogrooved patterns. *J R Soc Interface*. 2009 Jun 6;6 Suppl 3:S269-77.

Gao Y, Liu Y, Zhou L, Guo Z, Rong M, Liu X, et al. The Effects of Different Wavelength UV Photofunctionalization on Micro-Arc Oxidized Titanium. *PLoS One*. 2013 Jul 5;8(7):e68086.

Goldman M, Juodzbaly G, Vilkinis V. Titanium surfaces with nanostructures influence on osteoblasts proliferation: a systematic review. *J Oral Maxillofac Res*. 2014 Oct 1;5(3):e1.

Györgyey Á, Ungvári K, Kecskeméti G; Kopniczky J, Hopp B; Oszkó A et al. Attachment and proliferation of human osteoblast-like cells (MG-63) on laser-ablated titanium implant material. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013 Oct;33(7):4251-9.

He W, Andersson M, De Souza PPC, de Souza Costa CAS, Muñoz EM, Schwartz-Filho HO, et al. Osteogenesis-inducing calcium phosphate nanoparticle precursors applied to titanium surfaces. *Biomed Mater*. 2013 Jun;8(3):035007.

Huang YH, Xiropaidis AV, Sorensen RG, Albandar JM, Hall J, Wikesjö UM. Bone formation at titanium porous oxide (TiUnite) oral implants in type IV bone. *Clin Oral Implants Res*. 2005 Feb;16(1):105-11.

Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. FASEB J. 2006 May;20(7):811-27.

Kawase T, Tanaka T, Minbu H, Kamiya M, Oda M, Hara T. An atmospheric-pressure plasma-treated titanium surface potentially supports initial cell adhesion, growth, and differentiation of cultured human prenatal- derived osteoblastic cells. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2014 Aug;102(6):1289-96.

Kim K, Lee BA, Piao XH, Chung HJ, Kim YJ. Surface characteristics and bioactivity of an anodized titanium surface. J Periodontal Implant Sci. 2013 Aug;43(4):198-205.

Klein MO, Bijelic A, Toyoshima T, Götz H, von Koppenfels RL, Al-Nawas B, et al. Long-term response of osteogenic cells on micron and submicron-scale-structured hydrophilic titanium surfaces: sequence of cell proliferation and cell differentiation. Clin Oral Implants Res. 2010 Jun;21(6):642-9.

Klein MO, Bijelic A, Ziebart T, Koch F, Kämmerer PW, Wieland M, et al. Submicron scale-structured hydrophilic titanium surfaces promote early osteogenic gene response for cell adhesion and cell differentiation. Clin Implant Dent Relat Res. 2013 Apr;15(2):166-75.

Lai M, Hermann CD, Cheng A, Olivares-Navarrete R, Gittens RA, Bird MM, et al. Role of $\alpha 2 \beta 1$ integrins in mediating cell shape on microtextured titanium surfaces. J Biomed Mater Res A. 2014 Apr 15.

Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amourig Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. Dent Mater. 2007 Jul;23(7):844-54.

Lekholm U, Zarb G. in Tissue Integrated Protheses. Branemark, Zarb, Albrektson (eds): Chicago and Belin: Quintessence, 1985.

Li B, Li Y, Li J, Fu X, Li H, Wang H, et al. Influence of nanostructures on the biological properties of Ti implants after anodic oxidation. J Mater Sci Mater Med. 2014 Jan;25(1):199-205.

Linkow LI, Miller RJ. Immediate loading of endosseous implants is not new. J Oral Implantol. 2004;30(5):314-7.

Liu R, Lei T, Dusevich V, Yao X, Liu Y, Walker MP, Wang Y, Ye L. Surface Characteristics and Cell Adhesion: A Comparative Study of Four Commercial Dental Implants. J Prosthodont. 2013 Dec;22(8):641-51.

Mazor Z, Cohen, DK. Preliminary 3-dimensional surface texture measurement and early loading results with a microtextured implant surface. Int J Oral Maxillofac Implants. 2003 Sep-Oct;18(5):729-38.

Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology - from micron - to nanotopography. Biomaterials. 2008 Oct;29(28):3822-35.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

Muëller WD, Gross U, Fritz T, Voigt C, Fischer P, Berger G, et al. Evaluation of the interface between bone and titanium surfaces being blasted by aluminium oxide or bioceramic particles. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Jun;14(3):349-56.

Nakayanna GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cell growth and viability in vitro. *J Immunol Methods.* 1997 May 26;204(2):205-8.

Oliveira DP, Palmieri A, Carinci F, Bolfarini C. Osteoblasts behavior on chemically treated commercially pure titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2014 Jun;102(6):1816-22.

Park JY, Lee DH, Lee EJ, Lee SH. Study of cellular behaviors on concave and convex microstructures fabricated from elastic PDMS membranes. *Lab Chip.* 2009 Jul 21;9(14):2043-9.

Perrotti V, Palmieri A, Pellati A, Degidi M, Ricci L, Piattelli A, et al. Effect of titanium surface topographies on human bone marrow stem cells differentiation in vitro. *Odontology.* 2013 Jul;101(2):133-9.

Pivodova V, Frankova J, Dolezel P, Ulrichova J. The response of osteoblast-like SaOS-2 cells to modified titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013 Sep-Oct;28(5):1386-94.

Quirynen M, Al-Nawas B, Meijer HJA, Razavi A, Reichert TE, Schimmel M, et al. Small-diameter titanium Grade IV and titanium–zirconium implants in edentulous mandibles: three-year results from a double-blind, randomized controlled trial. *Clin Oral Implants Res.* 2014 Apr 9.

Rosa MB, Albrektsson T, Francischone CE, Schwartz Fo HO, Wennerberg A. The influence of surface treatment on the implant roughness pattern. *J Appl Oral Sci.* 2012 Sep-Oct;20(5):550-5.

Rosa MB, Albrektsson T, Francischone CE, Schwartz Filho HO, Wennerberg A. Micrometric characterization of the implant surfaces from the five largest companies in Brazil, the second largest worldwide implant market. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013 Mar-Apr;28(2):358-65.

Rosei F. Nanostructured surfaces: challenges and frontiers in nanotechnology. *Journal of Physics: Condensed Matter.* 2004; 16: S1373-S1436.

Sardinha SCS, Lanata-Flores AG, Pozzer L, Cavalieri-Pereira L, Olate S, Albergaria-Barbosa JR. Análisis topográfico de la superficie de implantes de titanio comercialmente puro a traves de microscopía electrónica de barrido. *Int. J. Odontostomat.* 2013;7:125-131.

Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol 2000.* 1998 Jun;17:22-35.

Schliephake H, Aref A, Scharnweber D, Bierbaum S, Sewing A. Effect of modifications of dual acid-etched implant surfaces on peri-implant bone formation. Part I: organic coatings. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Jan;20(1):31-7.

Schwartz O, Andreasen JO. Allotransplantation and autotransplantation of mature teeth in monkeys: the influence of endodontic treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 1988 Aug;46(8):672-81.

Schwartz FO, Novaes Jr AB, de Castro LMS, Rosa AL, de Oliveira, PT. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Jun;18(3):333-44.

Schwartz Z, Olivares-Navarrete R, Wieland M, Cochran DL, Boyan, BD. Mechanisms regulating increased production of osteoprotegerin by osteoblasts cultured on microstructured titanium surfaces. *Biomaterials.* 2009 Jul;30(20):3390-6.

Stadlinger B, Pourmand P, Locher MC, Schulz MC. Systematic review of animal models for the study of implant integration, assessing the influence of material, surface and design. *J Clin Periodontol.* 2012 Feb;39 Suppl 12:28-36.

Sul YT, Jeong Y, Johansson C, Albrektsson T. Oxidized, bioactive implants are rapidly and strongly integrated in bone. Part 1-experimental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Oct;17(5):521-6.

Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000 Sep-Oct;15(5):675-90.

Tan G, Tan Y, Ni G, Lan G, Zhou L, Yu P, et al. Controlled oxidative nanopatterning of microrough titanium surfaces for improving osteogenic activity. *Journal of materials science. J Mater Sci Mater Med.* 2014 Aug;25(8):1875-84.

Thalji, G, Gretzer, C, Cooper, LF. Comparative molecular assessment of early osseointegration in implant-adherent cells. *Bone.* 2013 Jan;52(1):444-53.

Toma HE. O mundo nanométrico: a dimensão do novo século. [2014] [citado 11 nov. 2014]. Disponível em https://s3-sa-east-1.amazonaws.com/ofitexto.arquivos/deg_230778.htm.

Uchiyama H, Yamada M, Ishizaki K, Sakurai K. Specific ultraviolet-C irradiation energy for functionalization of titanium surface to increase osteoblastic cellular attachment. J Biomater Appl. 2014 May;28(9):1419-29

Walter MS, Frank MJ, Sunding MF, Gómez-Florit M, Monjo M, Bucko MM, et al. Increased reactivity and in vitro cell response of titanium based implant surfaces after anodic oxidation. J Mater Sci Mater Med. 2013 Dec;24(12):2761-73.

Wang M, Ning Y, Zou H, Chen Si, Bai Y, Wang A, et al. Effect of Nd:YAG laser-nitriding-treated titanium nitride surface over Ti6Al4V substrate on the activity of MC3T3-E1 cells. Biomed Mater Eng. 2014;24(1):643-9.

Webster TJ, Hellenmeyer EL, Price RL. Increased osteoblast functions on theta + delta nanofiber alumina. Biomaterials. 2005 Mar;26(9):953-60.

Wennerberg A, Albrektsson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. Int J Oral Maxillofac Implants. 2000 May-Jun;15(3):331-44.

Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. Clin Oral Implants Res. 2009 Sep;20 Suppl 4:172-84.

Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces. A review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010 Jan-Feb;25(1):63-74.

Yeo IS, Han JS, Yang JH. Biomechanical and histomorphometric study of dental implants with different surface characteristics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 Nov;87(2):303-11

Zambuzzi WF, Bonfante EA, Jimbo R, Hayashi M, Andersson M, Alves G, Takamori ER, Beltrão PJ, Coelho PG, Granjeiro JM. Nanometer Scale Titanium Surface Texturing Are Detected by Signaling Pathways Involving Transient FAK and Src Activations. *PLoS One*. 2014 Jul 7;9(7):e95662.

Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Jul 1;74(1):49-58.

Zhao G; Raines AL; Wieland M; Schwartz Z; Boyan BD. Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials*. 2007 Jun;28(18):2821-9.

Zhuang XM, Zhou B, Ouyang JL, Sun HP, Wu YL, Liu Q, Deng FL. Enhanced MC3T3-E1 preosteoblast response and bone formation on the addition of nano-needle and nano-porous features to microtopographical titanium surfaces. *Biomed Mater*. 2014 Aug;9(4):045001.

Zuo J, Huang X, Zhong X, Zhu B, Sun Q, Jin C, et al. 2013. A comparative study of the influence of three pure titanium plates with different micro- and nanotopographic surfaces on preosteoblast behaviors. J Biomed Mater Res A. 2013 Nov;101(11):3278-84

ANEXO – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo **CEUA/FOUSP N° 021/2013** referente ao projeto intitulado: "**Caracterização das superfícies e adesão celular: Um estudo comparativo de quatro sistemas de implantes dentários brasileiros**" sob a responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. Maria da Graça Naclério Homem e das pesquisadoras Fabiana Ferreira Alves e Marcia Martins Marques, foi analisado na presente data e considerado isento de análise da CEUA por utilizar células de origem animal.

São Paulo, 17 de setembro de 2013.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Presidente do CEUA/FOUSP