**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

MARIA ALEJANDRA FRIAS MARTINEZ

**Adesão, proliferação e atividade de mineralização de
células da granulação óssea e fibroblastos gengivais
humanos em discos de titânio com diferentes superfícies
de tratamento: análise in vitro**

**BAURU
2015**

MARIA ALEJANDRA FRIAS MARTINEZ

Adesão, proliferação e atividade de mineralização de células da granulação óssea e fibroblastos gengivais humanos em discos de titânio com diferentes superfícies de tratamento: análise in vitro

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Reabilitação Oral.

Orientador: Profa. Dra. Adriana C P Sant'Ana

Versão Corrigida

BAURU

2015

Martinez, Maria Alejandra

F91a

Adesão, proliferação e atividade de mineralização de células da granulação óssea e fibroblastos gengivais humanos em discos de titânio com diferentes superfícies de tratamento: análise in vitro / Maria Alejandra Frias Martinez. – Bauru, 2015.

143 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Profa. Dra. Adriana Campos Passanezi Sant'Ana

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Comitê de Ética da FOB-USP

Nº CAAE: 32274419.9.0000.5417

Data: 12/12/2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, Antonio Manuel Frias Madera e Olga Mercedes Martinez Lugo, pelo apoio e incentivo que sempre tiveram comigo. Graças a vocês hoje vejo meu sonho se tornar realidade. Todo o que eu sou, eu devo a vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tantas bênçãos derramadas durante toda minha vida, por ser a fonte de luz e tranquilidade nos momentos de necessidade. Sempre tenho me considerado uma pessoa que acredita no poder da Fé, para o que alguns pensam que não existe eu poderia ter provas certas de que tenho um Deus que só tem coisas boas para nós.

Às minhas avós Maria Lugo (*in memoriam*) e Ecilda Madera (*in memoriam*) as duas pessoas que marcaram meu caminho, me mostrando o poder da Fe, e da perseverança, e que sem dúvida todo dia estão ao meu lado em pensamento e coração.

Aos meus pais Antonio e Olga, por ser um exemplo de dedicação, trabalho, superação, e responsabilidade. Obrigada por ter me brindando sempre o melhor que vocês conseguiram, por me apoiar nas decisões e ainda me dar forças para lograr e alcançar meus sonhos. Vocês tem sempre sido o sustento, o impulso, a vontade e as energias positivas para acreditar de que todo nesta vida e possível quando você quer que seja.

A minhas irmãs Olga Maria, Emely Maria e Estefany Frias, por ser minhas cúmplices em cada decisão tomada. Me sinto grata por ter vocês na minha vida, não poderia imaginar minha vida sem vocês, obrigada por me impulsarem a viver esta experiência maravilhosa.

A Gladys Madera e Yanina Frias, por ter me brindado os primeiros passos nesta profissão. Vocês são pessoas que admiro, por ter tanto desprendimento em ajudar as pessoas menos agraciadas e mais necessitadas, tenho certeza que o mundo fosse diferente se tivesse mais pessoas como vocês.

A meu tio Novel Frias e Mariana Lugo, por me mostrar as recompensas do trabalho árduo e por estar sempre presente em qualquer coisa que precisei, estou muito agradecida pelo amor e carinho que recibo a cada dia de parte de vocês.

A meus familiares quem também me apoiaram em todo momento, e faziam de aquele pouco tempo em casa fosse o melhor aproveitado da minha vida.

A minha orientadora em todo este caminho recorrido Prof. Dra. Adriana Campos Passanezi Sant'ana, por todo sua paciência, dedicação, interesse, ajuda, carinho e amor mostrado desde o primeiro dia em que a conheci. Em você conheci o mais alto nível de profissionalismo, inteligência e dedicação. Obrigada por todos os conhecimentos me doados durante todo esta etapa profissional. Agradeço imensamente por ter apostado e confiado em mi. Tê-la como orientadora e amiga foi um frutuoso presente que Deus me deu. Muito obrigada por toda a atenção mostrada neste trabalho.

A minha Co-Orientadora Prof. Dra. Carla Andreotti Damante, por todo o conhecimento da cultura celular. Obrigada por sempre ter me esclarecendo dúvidas e me ajudado na definição dos protocolos. Obrigada pela orientação nesta área da odontologia que aprendi apreciar e elogiar. Saiba que você foi peça fundamental na minha formação profissional.

Aos professores da Disciplina de Periodontia da FOB Prof. Dra. Maria Lucia Rubo de Rezende, Prof. Dra Mariana Schutzer Ragghianti Zangrando e Prof. Dr Sebastiao Aguiar Gregghi, por me guiar durante toda esta experiência, pelo conhecimento e sabedoria mostrados durante toda esta jornada, minhas mais sinceras gratidão para vocês.

Ao Prof. Dr. Euloir Passanezi, por todo o conhecimento brindado desde os primeiros dias na Faculdade de Odontologia de Bauru. A sua sabedoria com certeza tem enriquecido grandemente o meu saber na área da Periodontia.

Ao Professor Rodrigo Cardoso que atuou como colaborador no desenvolvimento deste trabalho. Estou extremamente grata por toda sua atenção e por ter ajudando a definir os protocolos. Obrigada por colocar a total disposição o Centro Integrado de Pesquisa.

Ao Professor Carlos Roberto Gradini e Fabio Bossoi Vicente da UNESP- Bauru, pela total disponibilidade de uso dos equipes da faculdade para o processamento das imagens em MEV realizadas nesta pesquisa.

À Profa. Dra. Ana Paula e Dra. Thais Helena Gasparoto, por toda disponibilidade e atenção em nos receber nas dependências do Departamento de Ciências Biológicas, disciplina de Microbiologia.

A Paula Karam, quem mais que uma colega terminou sendo uma boa amiga, agradeço a você cada dia e hora dedicada aos ensaios nesta pesquisa, não tenho duvida de que este trabalho é tanto meu como de você. Muito obrigada por me ajudar e se oferecer em todo momento, sacrificando teu tempo para que eu conseguisse realizar este trabalho.

A Bruna Ferraz por me orientar desses meus inicio neste mestrado, pelas recomendações e conselhos para ser melhor e por me ajudar na finalização da minha dissertação, muito obrigada por todo o tempo dedicado.

A Edimauro de Andrade do departamento de Endodontia desta faculdade, por sua disponibilidade em me ajudar na metalização das amostras para posterior análise no MEV.

A Flavia Amadeu, Marcia Graeff e Cinthia Tokuhara por me ajudarem nos ensaios desta pesquisa, sem duvida este trabalho não estaria completo se não fosse pela ajuda e dedicação que elas mostraram.

A Rafael Ferreira, obrigado por sempre se oferecer a me ajudar com tudo o que eu precisei, sempre vou lembrar de todo o que você fez por mim, me sinto grata por conhecer esse coração que todo mundo admira.

Aos queridos funcionários e amigos do departamento da Periodontia, Marcos Antonio de Godoy, Marcela Maria Pereira, Cleide Vital, em especial a Ivania Aruda e Edilaine Torencilla, por sempre mostrar sua disponibilidade para me ajudar em qualquer coisa que precisava. Obrigada a todos. Aos queridos amigos e funcionários do CIP, em especial a Heliton Lima, obrigada pelo carinho, e por tornarem minhas horas de trabalho laboratoriais mais agradáveis.

A meus amigos e companheiros do caminho, colegas de mestrado, estagio e doutorado, Lucas Cambriaghi, Paula Cunha, Andreia Pereira de Souza, Gustavo Manfredi, Luisa Valle, Raphaela Michel, Vitor Toledo Stuari, Isis Balderrama, Erica Spada de Carvalho, Giovanna Veronesi, Matheus Völz Cardoso, Alejandra Valdivia, Joao Barros, Renato Barros, Monica Ribeiro, Samira Salmeron e Sucel Morel. Vocês fizeram este Mestrado valer a pena. Sentirei saudades, mas espero que a amizade seja longa e duradoura. Obrigada!

Por ultimo, mas não menos importante, quero agradecer a vida, por colocar no meu caminho a pessoas que marcam tão profundo quanto podem, amigos da alma, irmãos do caminho, alguns que ainda na distancia fazem de meus dias longe, um lugar tranquilo fora de casa. A Peam Cespedes, Issa Marit Blanco, Carolina Filpo e Natalia Coral, por ficarem perto me animando em todo momento. A todas essas pessoas maravilhosas que tive a oportunidade de conhecer neste ano, Penelope Dominguez, Jose Mateo, Rocio Sanchez, Evelyn Rodriguez, Jeffrey Vargas, Luciane Osorio, Susana Matto, y a mis queridos Esmirna Morillo, Linda Cabral e Pietro Barone, os quais entraram no mais profundo do meu coração marcando cada passo forte e consistente. Obrigada por tantas risadas e momentos inesquecíveis.

A meu querido amigo, irmão e cúmplice de toda esta experiência desde o primeiro dia, Jeffrey Rojas Paulus, obrigada de coração por me suportar, aguentar e ajudar em qualquer coisa que passara na minha cabeça.

Nunca vou me esquecer de todas as pessoas maravilhosas que conheci nesta cidade em todo este tempo, meus maiores agradecimentos por todo o que vivi, sonhe e se tornou realidade sempre viverão presentes. OBRIGADA POR TODO!!!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru – USP na pessoa da excelentíssima diretora
Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

À Comissão da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do
Presidente, Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson.

Ao Curso de Pós-graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área de
Concentração em Reabilitação oral, linha de pesquisa de Periodontia da Faculdade de
Odontologia de Bauru – USP na pessoa de Prof. Dr. Sebastião Aguiar Gregghi,
responsável por esta área.

Ao Departamento de Protese, da FOB/USP, na pessoa do chefe Prof. Dr. Paulo Conti.

Ao Centro Integrado de Pesquisa (CIP), na pessoa do ex-coordenador Prof. Vinícius
Carvalho Porto e do atual coordenador Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, pela
autorização de acesso às dependências para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao patrocinador principal desta pesquisa, Neodent-JJGC Industria e comercio de
materiais dentários S.A pelo fornecimento dos discos utilizados nesta pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que a minha trajetória pelo
mestrado se tornasse mais prazerosa e proveitosa, meus mais sinceros agradecimentos!

Algún día lo entenderás. Alcanzarás tu meta, descubrirás lo grande que eres y las hazañas tan increíbles que has logrado en el camino. Encontrarás la paz y por fin podrás estar orgulloso de ti mismo. Esa es tu esperanza...

... No tenía ni idea de cómo iba a lograrlo. Lo que sí sabía era que no iba a dejar de perseguir mi sueño.

Fernando Trujillo Sanz

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar adesão, proliferação, atividade de fosfatase alcalina e de síntese de matriz mineralizada por células derivadas da granulação óssea (células GO-1) e fibroblastos gengivais humanos (FGH-1) em discos de titânio com diferentes tratamentos de superfícies. Discos de titânio comercialmente puro grau IV foram divididos em 4 grupos de acordo com o tratamento de superfície: (1) discos usinados – L (controle); (2) discos usinados seguido de jateamento abrasivo (JATO); (3) discos usinados, jateados e tratados por subtração ácida (superfície NeoPoros – NP); (4) discos com tratamento superficial para melhora da hidrofilia (superfície Acqua - ACQ). A microtopografia de superfície dos diferentes tipos de disco de titânio foi avaliada por meio de MEV. A composição química dos discos de titânio de superfícies L, JATO, NP e ACQ foi analisada por espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS). Para determinar a influência dos diferentes tratamentos de superfície sobre a adesão de células de linhagens fibroblásticas gengivais e osteoblásticas, foram cultivadas células GO-1 e FGH-1 sobre os discos de titânio dos diferentes grupos e as células aderidas foram avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) após 24h (adesão) e 48 h (proliferação). No ensaio de mineralização os discos de titânio foram corados com vermelho de alizarina para evidenciação dos nódulos de mineralização. Para avaliação da atividade de fosfatase alcalina, as células FGH-1 e GO-1 foram plaqueadas sobre discos de titânio, a atividade da FA foi observada nas células lisadas usando 25 µl da amostra em placa de 96 poços adicionado com 200 µL de fosfato p-nitrofenol (pNPP) e determinada em espectrofotômetro. Não houve diferenças entre os grupos para os parâmetros de rugosidade encontrados nas amostras, com exceção do parâmetro Rsk(asimetria), onde diferenças significantes foram observadas do grupo L em relação aos grupos JATO, NP e ACQ ($p < 0.05$). Os implantes de superfície L e NP apresentaram apenas Ti, a superfície JATO apresentou, além do Titânio, as substâncias Oxigênio e Alumínio enquanto na superfície ACQ foram observados Titânio, Sódio e Potássio. No período de 24 horas após o cultivo celular, houve maior proliferação de células FGH sobre as superfícies L ($89,43\% \pm 9,13$;) e JATO (100%), neste período, observou-se que 100% das superfícies JATO e ACQ estavam recobertas por células GO. Após 48h diferenças significantes entre o percentual de área recoberta por células FGH nas superfícies JATO comparativamente às superfícies NP e ACQ e,

para as células GO, entre as superfícies NP comparativamente às superfícies JATO e ACQ. Houve maior percentual de área recoberta pelas células GO do que pelas células FGH. Houve formação de nódulos mineralizados em todas as superfícies, análise comparativa mostrou diferenças estatisticamente significantes para as células GO cultivadas em DMEM sobre as superfícies L ($31,45\% \pm 1,51\%$) e ACQ ($54,94\% \pm 4,80\%$). A atividade de fosfatase alcalina foi maior em discos com superfície Lisa e hidrófila(ACQ). Esses resultados sugerem que todas as superfícies favorecem a adesão e proliferação de fibroblastos gengivais e células osteoblásticas humanas. Superfícies moderadamente rugosas favorecem a maior adesão e proliferação de células osteoblásticas, assim como maior atividade de mineralização in vitro.

Palavras-chave: titânio; implante osseointegrado; superfície; granulação óssea; fibroblastos

ABSTRACT

Adhesion, proliferation and mineralization activity of bone cells granulation and human gingival fibroblasts on titanium discs with different surface treatment: In vitro analysis.

The objective of this study was to investigate adhesion, proliferation, alkaline phosphatase activity and matrix synthesis mineralized by cells derived from the bone granulation (GO cells) and human gingival fibroblasts (HGF) in titanium disks with different surface treatment. Titanium discs commercially pure grade IV were used, divided into 4 groups according to the surface treatment: (1) machined discs - L (control); (2) machined discs followed by abrasive blasting (JATO); (3) machined discs, sandblasted and treated by acid subtraction (Neoporos surface - NP); (4) disks with surface treatment to improve the hydrophilic (Acqua surface - ACQ). The surface microtopography of different types of titanium disk was evaluated by SEM. The chemical composition of the surfaces of titanium disks, L, JET, NP and ACQ was analyzed by energy dispersive X-ray spectrometry (EDS). To determine the influence of different surface treatments on the cell adhesion of gingival fibroblast and osteoblast lines were cultured GO-1 and FGH-1 cells on titanium discs of different groups and the adhered cells were assessed by electron microscopy (SEM) after 24 (adherence) and 48 h (proliferation). To test the mineralization titanium disks were stained with alizarin red for disclosure of mineralization nodules. To evaluate the alkaline phosphatase activity, the FGH-1 and GO-1 cells were plated on titanium disks, AP activity was observed in cells lysed using 25 µl of sample in a 96 well plate with 200 µl added phosphate p nitrophenol (pNPP) and determined in spectrophotometer.. There were no differences between groups for the roughness parameters found in the samples, except for the parameter Rsk(asimetry) where significant differences were observed in the group L compared to JATO groups, NP and ACQ (p <0.05). The L and NP surface implants had only Ti, JATO surface showed, in addition to titanium, oxygen and the substances aluminum, while the ACQ surface were observed titanium, sodium and potassium. Within 24 hours after cell culturing, there was a greater proliferation of FGH on the cell surface L ($89.43 \pm 9.13\%$;) and JATO (100%), in this period, it was observed that 100% of the surfaces JATO and ACQ were covered by GO cells. After 48 hours there were significant differences between the percentage of area covered by FGH cells in JATO surfaces compared to NP surfaces and ACQ, and for GO

cells, between NP surfaces compared with the JATO and ACQ surfaces. There was a higher percentage of area covered by GO cells than by FGH cells. There mineralized nodule formation on all surfaces, comparative analysis revealed statistically significant differences for the GO cells cultured in DMEM on the surfaces L ($31.45\% \pm 1.51\%$) and ACQ ($54.94\% \pm 4.80\%$). Alkaline phosphatase activity was higher in discs with a smooth and hydrophilic surfaces (ACQ). These results suggest that all surfaces to promote adhesion and proliferation of gingival fibroblasts and human osteoblastic cells. Moderately rough surfaces leads to high adhesion and proliferation of osteoblast cells, as well as higher mineralization activity in vitro.

Keywords: titanium; osseointegrated implant; surface; bone granulation; fibroblasts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1** - Ilustração do disco de titânio comercialmente puro grau IV com diferentes tratamentos de superfície e dimensões de 2mm de espessura x 6 mm de diâmetro utilizados no estudo71
- Figura 2** - Distribuição dos discos de titânio em cada ensaio realizado no estudo, de acordo com os grupos de tratamento e células cultivadas 72
- Figura 3** - Aspecto das células e GO em cultura, observado em microscópio de fase. 75
- Figura 4** - Aspecto das células FGH em cultura, observado em microscópio de fase. 76
- Figura 5** - Esquema ilustrativo do ensaio de proliferação das células FGH-1 e GO-1 sobre discos de titânio nos períodos de 24 e 48 horas para cada grupo 77
- Figura 6** - Ilustração da calibração das imagem do ensaio de proliferação das células FGH-1 e GO-1 sobre discos de titânio nos períodos de 24 e 48 horas para cada grupo. 78
- Figura 7** - Ensaio de atividade alcalina . Em (A) Distribuição das amostras de células GO em DMEM + 10% FBS + 50 μ g/mL + β -glicerofosfato 10 mM na placa de 24 poços; (B) Remoção do meio de cultivo e lavagem com PBS; (C) Adição da solução tampão de lise celular; (D) Lise celular com ajuda de pinça clínica e ponta de pipeta; (E) Contagem de proteínas (Bradford); (F) Placa de 96 poços contendo as amostras para análise de atividade de fosfatase alcalina por meio de absorbância em espectofotometro. 80
- Figura 8** - Ensaio de mineralização. (A) Ilustração da tensão superficial nos discos de titânio com superfície Lisa, Jateada, Neoporos e Acqua (de izquierda a derecha); (B) Plaqueamento das células GO em placa de 24 poços, após a aderência, o meio foi trocado a cada 3 dias e os grupos de meio osteogênico foram suplementados com ácido ascórbico e β -glicerofosfato para indução osteogênica; (C) Retiro do meio sobrenadante e lavagem com PBS nos períodos de 14 e 28 dias após o cultivo; (D) Fixação das amostras com solução de formaldeído 4% durante 10 minutos; (E) Incubação com solução de alizarina durante 10 minutos; (F) Remoção do corante; (E) lavagem com água deionizada pura..... 81
-
-

Figura 9	- Plotagem tridimensional das superfícies L (A), JATO (B), NP (C) e ACQ (D) obtidas por meio do <i>plugin</i> Interactive 3D Surface Plot (ImageJ, NIH, USA) onde pode-se observar as características de rugosidade superficial das amostras.....	86
Figura 10	- (A) Imagem em MEV (aumento de 500X) de disco de superfície L; (B) imagem da superfície L após análise das características de superfície pelo programa ImageJ; (C) plotagem bidimensional de superfície de disco L (400 x 400 pixels); (D) Perfil de superfície de disco de superfície L	87
Figura 11	- (A) Imagem em MEV (aumento de 500X) de disco de superfície JATO; (B) imagem da superfície JATO após análise das características de superfície pelo programa ImageJ; (C) plotagem bidimensional de superfície de disco JATO (400 x 400 pixels); (D) Perfil de superfície de disco de superfície JATO.....	88
Figura 12	- (A) Imagem em MEV (aumento de 500X) de disco de superfície NP; (B) imagem da superfície NP após análise das características de superfície pelo programa ImageJ; (C) plotagem bidimensional de superfície de disco NP (400 x 400 pixels); (D) Perfil de superfície de disco de superfície NP	89
Figura 13	- (A) Imagem em MEV (aumento de 500X) de disco de superfície ACQ; (B) imagem da superfície ACQ após análise das características de superfície pelo programa ImageJ; (C) plotagem bidimensional de superfície de disco ACQ (400 x 400 pixels); (D) Perfil de superfície de disco de superfície ACQ.....	90
Figura 14	- Caracterização dos discos de superfície L. (A) Imagem em MEV (aumento de 500x); (B) Mapeamento da superfície; (C) espectro de EDS para a área analisada. Note os picos do elemento Ti presentes.....	92
Figura 15	- Caracterização dos discos de superfície NP. (A) Imagem em MEV (aumento de 500x); (B) Mapeamento da superfície; (C) espectro de EDS para a área analisada. Note os picos do elemento Ti presentes.....	92
Figura 16	- Caracterização dos discos de superfície JATO. (A) Imagem em MEV (aumento de 500x); (B) Mapeamento da superfície (O); (C) Mapeamento da superfície (Al); (D) Mapeamento da superfície (Ti); (E) mistura dos canais mapeados (O, Al, Ti); (F) espectro de EDS para a área analisada, contendo os picos dos elementos Ti, O e Al.....	93

Figura 17 - Caracterização dos discos de superfície ACQ. (A) Imagem em MEV (aumento de 500x); (B) Mapeamento da superfície (Na); (C) Mapeamento da superfície (Cl); (D) Mapeamento da superfície (Ti); (E) mistura dos canais mapeados (Na, Cl, Ti); (F) espectro de EDS para a área analisada, contendo os picos dos elementos Ti, Na e Cl.....	94
Figura 18 - Teste de adesão e proliferação celular sobre discos de superfície L. Em (A), fotomicrografia de MEV em aumento de 500x de disco do grupo L. Em (B), células FGH cultivadas por 24 horas; em (C), células GO cultivadas por 24 horas; em (D) células FGH cultivadas por 48 horas; (E) células GO cultivadas por 48 horas.	96
Figura 19 - Teste de adesão e proliferação celular sobre discos de superfície JATO. Em (A), fotomicrografia de MEV em aumento de 500x de disco do grupo JATO. Em (B), células FGH cultivadas por 24 horas; em (C), células GO cultivadas por 24 horas; em (D) células FGH cultivadas por 48 horas; (E) células GO cultivadas por 48 horas.	97
Figura 20 - Teste de adesão e proliferação celular sobre discos de superfície NP. Em (A), fotomicrografia de MEV em aumento de 500x de disco do grupo NP. Em (B), células FGH cultivadas por 24 horas; em (C), células GO cultivadas por 24 horas; em (D) células FGH cultivadas por 48 horas; (E) células GO cultivadas por 48 horas.	98
Figura 21 - Teste de adesão e proliferação celular sobre discos de superfície ACQ. Em (A), fotomicrografia de MEV em aumento de 500x de disco do grupo ACQ. Em (B), células FGH cultivadas por 24 horas; em (C), células GO cultivadas por 24 horas; em (D) células FGH cultivadas por 48 horas; (E) células GO cultivadas por 48 horas.	99
Figura 22 - Percentual de área do disco recoberto por células (média $\pm$ desvio-padrão) no período de 24 horas, de acordo com os grupos. Símbolos iguais representam diferenças significantes entre os grupos. * $p < 0.01$; Kruskal-Wallis <i>post hoc</i> Dunn; ** $p < 0.0001$; Kruskal-Wallis <i>post hoc</i> Dunn; + $p < 0.005$; Kruskal-Wallis <i>post hoc</i> Dunn; □ Diferenças significantes entre os grupos ACQ-FGH e ACQ-GO (Kruskal-Wallis <i>post hoc</i> Dunn).....	100

-
-
- Figura 23** - Percentual de área do disco recoberto por células (média $\pm$ desvio-padrão) no período de 48 horas, de acordo com os grupos. Símbolos iguais representam diferenças significantes entre os grupos. * $p < 0.01$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; ** $p < 0.0005$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; + $p < 0.0001$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; □ Diferenças significantes entre os grupos ACQ-FGH e ACQ-GO (Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn)..... 101
- Figura 24** - Escores de proliferação celular (média $\pm$ desvio-padrão) no período de 24 horas, de acordo com os grupos. Símbolos iguais representam diferenças significantes entre os grupos. * $p < 0.05$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; ** $p < 0.0001$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; *** $p < 0.005$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; **** $p < 0.0001$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; □ Diferenças significantes entre os grupos ACQ-FGH e ACQ-GO ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn)..... 102
- Figura 25** - Escores de proliferação celular (média $\pm$ desvio-padrão) no período de 48 horas, de acordo com os grupos. Símbolos iguais representam diferenças significantes entre os grupos. * $p < 0.01$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; ** $p < 0.0005$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; *** $p < 0.001$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; □ Diferenças significantes entre os grupos ACQ-FGH e ACQ-GO ($p < 0.01$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn)..... 103
- Figura 26** - (A) Disco de superfície L cultivado com células GO em meio DMEM por 14 dias.; (B) Disco de superfície L cultivado com células GO em meio OST (osteogênico). As imagens quadradas representam $\frac{1}{4}$ da superfície do disco analisado..... 104
- Figura 27** - (A) Disco de superfície JATO cultivado com células GO em meio DMEM por 14 dias.; (B) Disco de superfície JATO cultivado com células GO em meio OST (osteogênico). As imagens quadradas representam $\frac{1}{4}$ da superfície do disco analisado..... 105
- Figura 28** - (A) Disco de superfície NP cultivado com células GO em meio DMEM por 14 dias.; (B) Disco de superfície NP cultivado com células GO em meio OST (osteogênico). As imagens quadradas representam $\frac{1}{4}$ da superfície do disco analisado..... 106
- Figura 29** - (A) Disco de superfície ACQ cultivado com células GO em meio DMEM por 14 dias.; (B) Disco de superfície ACQ cultivado com células GO em meio OST (osteogênico). As imagens quadradas representam $\frac{1}{4}$ da superfície do disco analisado..... 107
-
-

Figura 30 - Percentual (média $\pm$ desvio-padrão) de área mineralizada produzida pelas células GO nos diferentes grupos (L, JATO, NP e ACQ), meios de cultivo (DMEM- convencional ou OST- osteogênico) e períodos de tempo (14 dias ou 28 dias). * $p=0.0044$; Kruskal-Wallis <i>post-hoc</i> Dunn.....	108
Figura 31 - Atividade de fosfatase alcalina das células de FGH-1 e GO-1 cultivadas em meio não osteogênico constituído por DMEM + 10% SFB e em meio osteogênico (OSTEO) DMEM + 10% SFB + 50 $\mu\text{g/ml}$ ácido ascórbico + 10mM β -glicerofosfatono período de 14 dias.	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Tipos de superfície e parâmetros de rugosidade superficial dos principais sistemas de implantes (relativamente à participação de mercado mundial) descritos por WENNERBERG, ALBREKTSSON (2009)	30
Tabela 2	- Índice de adesão celular	79
Tabela 3	- Valores de rugosidade de superfície analisados no plugin SurfJar (ImageJ, NIH, EUA) [Comprimento da amostra: 100µm, nivelamento de superfície]	85
Tabela 4	- Composição química dos discos de titânio com diferentes tratamentos de superfície (análise em EDS)	91

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
AB	Antibiótico
ACQ	Superfície Acqua
Al	Alumínio
ALP	Fosfatase Alcalina
Anfo-B	Anfotericina B
ANOVA	Teste de análise de variância
BSP	Sialoproteína Óssea
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CTMs	Células tronco mesenquimais
Dr(a).	Doutor(a)
EBM	Electron beam melting
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
et al.	E outros; Colaboradores
FGH-1	Fibroblastos gengivais humanos
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
GO-1	Granulação Óssea
HA	Hidroxiapatita
IL-6	Interleucina 6
Jato	Superfície Jateada
L	Superfície Lisa
LH	Lisis hidroxilases
LOXs	Lisis oxidades
MC	Microscopia confocal
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
mg	Miligramma
ml	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
MO	Microscopia Ótica
modSLA	Superfícies SLA modificadas/ hidrofílicos
nm	Nanômetro(s)
NP	Superfície Neoporos
O	Oxigênio
OCN	Osteocalcina
OPN	Osteopontina
Osteo	Osteogênico
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)
PCR-real time	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pNPP	Fosfato p-nitrofenol
Prof(a).	Professor(a)
PT	Pre-tratamento

Ra	Desvio médio aritmético de um perfil
Rq	Desvio da raiz quadrada media de um perfil
Sa	Desvio médio aritmético de uma superfície
Sdr	Proporção de área superficial
SFB	Soro fetal bovino
SLA	Superfície acido-jateada
Sq	Desvio da raiz quadrada media de uma superfície
Ti	Titânio
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TPS	Titanium plasma-spray
U	Superfície Usinada
USP	Universidade de São Paulo
vs	<i>Versus</i>
XPS	Espectroscopia fotoeletrônica por Raios X
XRD	Difração de raios X
Zr	Zircônio
α	Alfa
β	Beta
μg	Micrograma
$\mu\text{g/ml}$	Micrograma por mililitros (medida de concentração)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	CARACTERISTICAS DA SUPERFICIES DOS IMPLANTES.....	29
2.1.1	Parâmetros de rugosidade de superfície	29
2.1.2	Métodos para análise da rugosidade superficial.....	30
2.1.3	Formas de alteração da topografia de superfície dos implantes.....	33
2.1.4	Padrão de osseointegração de implantes com diferentes tratamento de superfície	34
2.2	CULTURA DE CELULAS SOBRE DIFERENTES SUPERFICIES DE IMPLANTES.....	40
2.3	ENSAIOS DE MINERALIZAÇÃO SOBRE DIFERENTES SUPERFICIES DE IMPLANTES.....	57
2.4	TECNICA DO ENXERTO ÓSSEO EM NEOFORMAÇÃO: ESTUDOS EM MODELOS ANIMAIS E EM SERES HUMANOS.....	59
2.5	CARACTERISTICAS DO TECIDO DE GRANULAÇÃO PRESENTE EM ALVEOLOS EM REPARAÇÃO.....	60
3	PROPOSIÇÃO	65
3.1	OBJETIVO GENERAL	67
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	67
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	69
4.1	AMOSTRAS DE TITÂNIO.....	71
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA MICROTOPOGRAFIA DA SUPERFICIE	73
4.3	ANÁLISE EDS (“ENERGY DISPERSIVE X-RAY DETECTOR OU ESPECTROMETRIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X”).....	73
4.4	CULTURA DE CÉLULAS DE LINHAGEM OSTEOLASTICA (CÉLULAS GO-1)	73
4.5	CULTURA DE FIBROBLASTOSS GENGIVAIIS HUMANOS (CÉLULAS FGH-1).....	75

4.6	ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DAS CELULAS DE LINHAGEM FIBROBLASTICA (CÉLULAS FGH-1) E OSTEOLASTICA (CÉLULAS GO-1) SOBRE OS DISCOS DE TITÂNIO COM DIFERENTES TRATAMENTO SUPERFICIAIS	76
4.7	ENSAIO DE ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA.....	79
4.8	ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO.....	80
4.9	ANALISE ESTATISTICA.....	81
5	RESULTADOS.....	83
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA MICROTOPOGRAFIA DE SUPERFICIE.....	85
5.2	EDS	91
5.3	ENSAIO DE ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	95
5.3.1	PERCENTUAL DE AREA DO DISCO RECOBERTA POR CELULAS	95
5.3.2	ANALISE DOS PARAMETROS DE PROLIFERACAO CELULAR SOBRE OS DISCOS DE TITÂNIO (ESCORE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR)	101
5.4	ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO.....	103
5.5	ENSAIO DE FOSFATASE ALCALINA	108
6	DISCUSSÃO	111
7	CONCLUSÕES	123
	REFERÊNCIAS	127
	ANEXOS	139

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os implantes dentários representam uma alternativa adequada para a substituição de dentes perdidos. Uma ligação direta, estrutural e funcional entre o osso e a superfície do implante dentário se desenvolve durante o processo de integração óssea, onde osteoblastos responsáveis pela formação do tecido ósseo desempenham papel principal (Steinemann 1998).

A osseointegração é definida como a união direta entre o osso vital e o implante, ao nível de microscopia ótica (Albrektsson 1981). Desde sua descoberta, os implantes evoluíram significativamente, especialmente em relação aos tratamentos superficiais, os quais visam melhora na qualidade da osseointegração, e nos recursos protéticos e de técnica cirúrgica que resultem em melhora estética e funcional (Albrektsson 2005).

O estabelecimento da osseointegração depende basicamente dos seguintes parâmetros: material, desenho do implante, técnica cirúrgica para instalação dos implantes e qualidade do tecido ósseo (Albrektsson 1981), sendo que os fatores que não estão diretamente relacionados às características dos implantes são igualmente importantes no estabelecimento da osseointegração, incluindo cuidados de técnica cirúrgica e condições de carga do implante (Albrektsson 1987).

A topografia de superfície dos implantes de titânio tem sido considerada como um dos fatores essenciais para o sucesso dos implantes odontológicos. Nos últimos anos, a investigação científica em implantes dentários tem sido focada principalmente no desenvolvimento de novas modificações de superfície ou revestimentos especiais capazes de melhorar as características biológicas do titânio (Wennerberg 2009).

A biocompatibilidade do biomaterial está intimamente relacionada com o comportamento das células (Anselme 1999). A microtopografia da superfície do implante influencia a adesão, diferenciação, proliferação e formação da matriz extracelular (Elias 2010; Lange 2002; Magnani 2003; Rupp 2004; Boyan et al. 2003; Le Guehennec 2008). Osteoblastos tendem a assumir morfologia mais diferenciada em superfícies mais rugosas, com redução do número de células aderidas, as quais apresentam menores taxas proliferativas e expressão aumentada de marcadores de diferenciação osteoblástica, respondendo à ação de hormônios e fatores de crescimento com características próprias de células diferenciadas (Boyan et al. 2003). Células osteoblásticas cultivadas sobre superfícies ósseas com reabsorção osteoclástica

apresentam respostas semelhantes, demonstrando a importância das características microtopográficas na remodelação óssea *in vivo*.

As características de rugosidade superficial influenciam o comportamento de células mesenquimais osteoprecursoras, podendo estimular sua proliferação e induzir sua diferenciação em osteoblastos (Vallés 2008; Lüthen 2005), os quais apresentam afinidade a superfícies moderadamente rugosas que lhes permitem a adesão em contatos focais, reduzindo a força adesiva geral (Nebe 2004; Bagno 2004). Adicionalmente, a microrrugosidade também pode modular a capacidade dos osteoblastos a sintetizar e secretar fatores que favoreçam a osteogênese e, ao mesmo tempo, controlar a atividade osteoclástica (Boyan et al. 2003).

Esses achados sugeriram a possibilidade de que diferentes tratamentos de superfície tenham efeito sobre o crescimento de tecido ósseo na rosca do implante, considerando-se que diferentes propriedades da superfície dos implantes e sua rugosidade podem afetar o processo de osseointegração (Albrektsson 2008; Albrektsson 2013; Giavaresi 2003; Hazan 1993; Heo 2011; Kim 2003; Larsson 1996; Wennerberg 2009). Desta forma, a investigação de diferentes tipos de tratamento de superfície dos implantes deve ser realizada *in vitro* e *in vivo*, permitindo a compreensão dos eventos celulares básicos que determinam a formação óssea ao redor dos implantes.

Alguns tipos celulares apresentam a capacidade de diferenciação em outros tipos capazes de induzir a formação óssea e, ao mesmo tempo, inibir a atividade osteoclástica (Boyan et al. 2003). Recentemente, células presentes em alvéolos em cicatrização (Passanezi et al. 1989; Sant'Ana et al. 2012) foram coletadas e, a partir destas, foi estabelecida linhagem celular a partir de cultura primária. Essas células foram caracterizadas *in vitro*, onde se observou características morfológicas compatíveis com células osteoblásticas, com alta taxa de proliferação, atividade de fosfatase alcalina e síntese de matriz mineralizada em meio convencional e osteogênico (Valdívia 2013). Esses achados sugerem o potencial de formação de novo tecido ósseo a partir dessas células, o que poderia ser particularmente interessante quando da existência de perda óssea ao redor dos implantes requerendo intervenções terapêuticas visando a reosseointegração. No entanto, ainda não se sabe qual é o comportamento dessas células sobre diferentes superfícies de implantes e como as superfícies dos implantes podem influenciar o comportamento celular, sendo este o objetivo deste estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características de superfície dos implantes

2.1.1. Parâmetros de rugosidade de superfície

Os principais parâmetros de rugosidade superficial investigados são (Wennerberg, Albrektsson 2009a):

- Ra: desvio médio aritmético de um perfil (bidimensional);
- Sa: desvio médio aritmético de uma superfície (tridimensional);
- Rq: desvio da raiz quadrada média de um perfil (bidimensional);
- Sq: desvio da raiz quadrada média de uma superfície (tridimensional) - fornece informações semelhantes ao Ra, mas é mais sensível aos picos elevados e vales baixos;
- Rz: altura de dez pontos, ou seja, média dos cinco vales mais baixos e cinco picos mais altos dentro de um perfil (bidimensional);
- Sz: altura de dez pontos, ou seja, média dos cinco vales mais baixos e cinco picos mais altos dentro de uma superfície (tridimensional);
- Rt: distância pico-vale máxima do perfil (dimensional);
- St: distância pico-vale máxima da superfície (tridimensional).

De acordo com WENNERBERG e ALBREKTSSON em 2009, a investigação das características dos implantes deve ser realizada preferencialmente no aspecto tridimensional, tomando por base a rugosidade média sobre a superfície (valor Sa), cujo valor é mais importante do que a rugosidade média (Ra), uma medida bidimensional. O Sa fornece dados quanto aos desvios médios de altura em uma determinada área e não apenas na superfície, como o Ra. O valor do Sa não é influenciado pela direção da medida, ou seja, se o perfil de superfície é

medido ao longo ou transversalmente à direção dominante das irregularidades de superfície. De forma geral, se observa correlação positiva entre aumento dos valores de Ra ou Sa e integração óssea mais forte. Além desses, pelo menos um parâmetro espacial ou híbrido é necessário para análise adequada da superfície, dentre estas a proporção de área superficial (Sdr), parâmetro híbrido que informa o número e altura dos picos de determinada superfície. Estudos em modelos animais revistos pelos autores demonstraram que Sa de aproximadamente 1.5µm e Sdr de aproximadamente 50% (rugosidade moderada) promove resposta óssea mais forte do que superfícies mais rugosas ou mais lisas. Ainda em sua revisão, demonstraram os valores de Sa e Sdr dos principais sistemas de implantes vendidos ao redor do mundo. Na Tabela 1, a seguir, apresenta-se um resumo dos parâmetros de rugosidade (Sa e Sdr) dos principais tipos de implantes vendidos ao redor do mundo, a partir dos dados revistos pelos autores:

Tabela 1- Tipos de superfície e parâmetros de rugosidade superficial dos principais sistemas de implantes (relativamente à participação de mercado mundial) descritos por WENNERBERG, ALBREKTSSON (2009)

Nome (marca comercial)	Tratamento de superfície	Sa (em µm)	Sdr (em %)
TiUnite (Nobel Biocare)	Anodização	1.1	37
SLA(1) (Straumman)	Ácido e jateamento	1.5	34
SLA(2) (Straumman)	Ácido e jateamento	1.78	97
SLActive (Straumman)		1.75	143
Osseotite (Biomet 3i)	Ácido	0.68	27
Nanotite (Biomet 3i)	Incorporação de HA (20nm)	0.5	40
TiOBlast (Astra Tech)	Jateamento com partículas micronizadas de dióxido de titânio	1.1	31
OsseoSpeed (AstraTech)	Íons flúor	1.4	37%
Bränemark (original)	Usinado	0.9	34

2.1.2 Métodos para análise da rugosidade superficial

A caracterização e quantificação das estruturas de superfície podem ser realizadas por meio de diferentes métodos, incluindo perfilometria de contato, perfilometria à laser, interferometria de luz branca, microscopia confocal, microscopia força atômica e microscopia eletrônica de varredura, oferecendo alta resolução e descrição detalhada das estruturas,

podendo ser utilizada para calcular mapas tridimensionais. CHINGA et al. em 2007 avaliaram uma série de parâmetros usados para descrição de superfícies tridimensionais, incluindo rugosidade, magnitude, direção de gradientes e área de superfície (S_a). A caracterização e quantificação de superfície foi realizada por um *plugin* do software ImageJ, denominado SurfCharJ, o qual se baseia em várias rotinas para avaliação de superfície e fornece dados quanto à análise global e local de rugosidade, análise de gradiente, segmentação dominante, nivelamento superficial e análise direcional. Várias medidas de rugosidade superficial podem ser derivadas a partir da análise, incluindo desvio da média aritmética, da raiz quadrada média, assimetria e achatamento da superfície avaliada.

Propriedades de superfície de implantes de titânio orais desempenham papéis decisivos para interações moleculares, resposta celular e regeneração óssea. No entanto, o papel das propriedades de superfície específicas, tais como, características de composição química, de fase e de nanoescala, para o desempenho biológico *in vivo*, ainda não foi estabelecido. Palmquist et al 2010 sugerem que nos resultados disponíveis de alguns ensaios clínicos randomizados, não há nenhuma evidência de que qualquer tipo de implante dentário, tem sucesso superior a longo prazo. Importantes descobertas sobre o recrutamento de células-tronco mesenquimais, comunicação célula-célula, imagens de alta resolução da interface entre o óxido de superfície e o anfitrião biológico são pré-requisitos para a compreensão dos mecanismos de osseointegração. Estratégias para o desenvolvimento da próxima geração de modificações de superfície de material para o tecido comprometido são susceptíveis de incluir o tempo e as propriedades funcionais programadas, a modulação farmacológica e incorporação de componentes celulares.

Os efeitos de parâmetros de processo de um sistema de EBM(electron beam melting), sobre a microestrutura e a rugosidade da superfície do Ti-6Al- 4V foram investigados por Safdar em 2010. Os parâmetros de processamento do sistema de EBM incluíram corrente de feixe, velocidade de digitalização, desvio de focagem e do comprimento de varrimento. Neste estudo três lotes diferentes de amostras foram preparadas. Microestruturas de EBM construído com Ti-6Al-4V foram estudadas através de microscopia ótica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e difração de raios-X (XRD). A microscopia confocal (CM) e análise de imagens no ImageJ com códigos de rotina para SurfCharJ foram usadas para quantificar a rugosidade da superfície das placas de ensaio. A sequência de transformação de fase em EBM construído por Ti-6Al-4V foi discutida de acordo com a história de processamento e microestruturas que foram observadas. Tem sido

observado que, o tamanho, número e geometria de grão colunar β dependem da configuração da espessura da amostra e de outros parâmetros do processo. O diâmetro de grãos colunares varia entre 2-70 μm . Observou-se o aumento em tamanho, número e regularidade de grãos colunares com o aumento da espessura da amostra, a densidade de energia do feixe e o comprimento de varrimento. Embora com o aumento da altura da compilação diminui. A espessura da amostra e a densidade de energia do feixe tiveram um forte efeito sobre a rugosidade da superfície das placas de ensaio. O valor do coeficiente de rugosidade superficial R_a para diferentes placas de teste varia entre 1-20 μm . Observou-se que a rugosidade da superfície da placa teste, aumentou com o incremento da espessura da placa e densidade de energia do feixe.

Durante séculos, os cirurgiões-dentistas vêm tentando substituir dentes perdidos com materiais sintéticos adequados. Os implantes dentários são acessórios que servem como substitutos para a raiz do dente natural ausente e vem se tornando populares na prática odontológica atualmente. Um número de fatores sistêmicos e locais influenciam a produção de uma interface osseointegrada e, portanto, a estabilidade do implante. No entanto, as características de superfície dos materiais de implante, de maneira geral, e a rugosidade superficial, em especial, tem recebido uma grande atenção nos últimos anos para ajudar a conseguir uma interação favorável entre o implante e tecidos biológicos. Alla et al em sua revisão de literatura de 2011 sugerem que embora sejam vários os métodos mecânicos que podem ser utilizados para produzir a rugosidade nas superfícies de implantes de titânio, as propriedades da camada de óxido da superfície são mais difíceis de controlar. Os tratamentos químicos de superfície dos implantes são principalmente utilizados para melhorar a camada de óxido, com espessura necessária para a estabilidade do metal. Vários métodos alternativos são discutidos e utilizados para a produção da camada superficial sobre os implantes de titânio, como morfologia, espessura, microestrutura e a composição química variável. Nos tratamentos térmicos, rugosidade da superfície e a quantidade da formação da camada de óxido são dependentes da temperatura e tempo. O tratamento a laser da superfície, por outro lado, pode ser usado para produzir a rugosidade desejada da superfície, sem qualquer contaminação. Alguns métodos são discutidos e estão bem estabelecidos, sendo utilizados pelos fabricantes de implantes dentários nos dias atuais. Embora estes métodos tenham sido desenvolvidos e utilizados para produzir implantes dentários, com diferentes topografias de superfície e com sucesso, o efeito das topografias superficiais sobre a compatibilidade biológica e a osseointegração, com longa duração, não foi muito bem estabelecido ainda.

2.1.3 Formas de alteração da topografia de superfície dos implantes

A topografia de superfície dos implantes após a usinagem pode ser alterada por meio de métodos subtrativos ou aditivos. Nos métodos subtrativos, partículas são removidas do corpo do implante por meio de diferentes tratamentos, criando poros ou depressões superficiais (superfície côncava), enquanto que nos métodos aditivos, partículas são adicionadas ao corpo do metal, criando picos (superfície convexa). Os métodos subtrativos incluem eletropolimento, polimento mecânico, jateamento, condicionamento ácido e oxidação enquanto que os métodos aditivos incluem revestimento de superfície com hidroxiapatita e cálcio, spray de titânio e deposição iônica. A topografia de superfície, segundo WENNERBERG e ALBREKTSSON em 2009a depende da orientação e rugosidade superficial. Diferentes procedimentos de usinagem resultam em orientações superficiais diferentes. Quando a orientação da superfície é clara denomina-se superfície anisotrópica, enquanto que uma superfície sem orientação é denominada de isotrópica.

Anodização: o implante é colocado em um ânodo em célula galvânica com eletrólito que contém ácido fosfórico (Wennerberg, Albrektsson 2009). Após o posicionamento de corrente através da célula galvânica, a camada de óxidos superficiais cresce a partir do estado nativo de aproximadamente 5nm de espessura até cerca de 10.000nm.

A revisão de Mendonça et al. 2008, investigaram o papel da modificação topográfica em nanoescala dos substratos de titânio com a finalidade de melhorar a integração óssea. A nanotecnologia oferece aos engenheiros e biólogos novas maneiras de interagir com processos biológicos. Além disso, a nanotecnologia tem proporcionado meio um de compreensão para conhecer as funções específicas das células. Os dados existentes apoiam o papel da nanotopografia e sugerem que, na osseointegração, podem ser modulados por essas modificações em nanoescala. Essas modificações podem alterar as respostas celulares e teciduais podendo beneficiar a osseointegração e terapia com implantes dentários.

No passado, diversas modificações específicas das propriedades da superfície, tais como a topografia, a estrutura, a química, a carga superficial e a molhabilidade, sendo investigados para melhorar, previsivelmente, a osseointegração de implantes dentários. Schwarz et al em 2009 avaliaram, com base na evidência disponível, o impacto da superfície hidrofílicas para implantes dentários. Um tratamento de superfície foi realizada para produzir superfícies de titânio hidroxilados / hidratados com microestrutura idênticos, aos substratos ou

ácido-gravadas, ou com jato de areia, ou grandes jatos e ácido-gravadas, mas com caráter hidrofílico. Estudos preliminares *in vitro* indicaram que as propriedades das superfícies hidrófilas têm uma influência significativa sobre a diferenciação e produção de fator de crescimento pelas células. As experiências com animais têm apontado que as superfícies hidrofílicas melhoram os estágios iniciais de integração com os tecidos moles e duros, tanto para os implantes não-submersos ou submersos. Estes dados também vão de acordo com os estudos clínicos preliminares.

A taxa de sucesso de implantes de titânio para aplicações dentárias e ortopédicas depende da capacidade do tecido ósseo circundante em integrar-se com a superfície do implante e manter-se longitudinalmente, como em pacientes com alterações sistêmicas. Segundo Gittens et al 2011, as propriedades e estimulação elétrica do osso têm sido mostrados para controlar o seu crescimento e cura, podendo melhorar a integração óssea. Células ósseas também são sensíveis aos produtos químicos gerados durante eventos de corrosão, mas pouco se sabe sobre como os sinais elétricos associados à corrosão podem afetar a osseointegração. A natureza metálica dos materiais utilizados para aplicações de implantes e os ambientes corrosivos encontrados no corpo humano, em combinação com as cargas contínuas e cíclicas, podem levar à corrosão e seus correspondentes produtos electroquímicos. As correntes elétricas anormais produzidas durante a corrosão pode converter qualquer implante metálico em um eletródo, com impacto negativo sobre o tecido circundante, podendo levar ao mau desempenho e rejeição do implante.

2.1.4 Padrão de osseointegração de implantes com diferentes tratamentos de superfície

Em revisão sistemática publicada em 2009, WENNERBERG e ALBREKTSSON concluíram que:

- Implantes jateados demonstraram melhor integração óssea que implantes usinados apenas. Os valores Ra/Sa claramente distintos relatados nos estudos revistos podem ser resultado de diferentes equipamentos e métodos de avaliação empregado nos diversos estudos. Ao contrário dos estudos em modelos animais, os estudos clínicos revistos não mostraram vantagens ou desvantagens
-

significativas no uso de implantes jateados comparativamente aos implantes usinados;

- Implantes com superfície tratada por ácido demonstraram melhor osseointegração que implantes usinados, em modelos animais. O tratamento ácido leva a um pequeno aumento ou até mesmo à diminuição da altura média. Essas superfícies apresentaram melhor osseointegração que implantes de superfície mais rugosa, embora resultados conflitantes sejam encontrados na literatura. Não foram relatadas diferenças clínicas significativas na comparação de superfícies tratadas por ácido em relação às superfícies usinadas;
 - Superfícies jateadas e condicionadas por ácido são geralmente comparadas com superfícies usinadas e, sem exceção, apresentam integração mais forte com o tecido ósseo. A comparação com outros tipos de superfície não apresenta resultados tão claros, porém as superfícies *titanium plasma-spray (TPS)* frequentemente demonstraram menor integração do que as superfícies jateadas e condicionadas por ácido. A topografia de superfície desses implantes é bastante variável entre os diferentes estudos, dependentes dos diferentes equipamentos e métodos de avaliação além dos métodos de jateamento e tratamento ácido. De forma geral, os implantes jateados e condicionados por ácido apresentam superfície moderadamente rugosa;
 - Implantes de superfície oxidada demonstraram maior osseointegração do que implantes usinados, segundo estudos realizados em animais e seres humanos, sendo especialmente vantajoso na utilização de carga precoce. Não existiu correlação entre o desvio de altura e a osseointegração, embora implantes anodizados sejam minimamente rugosos e a comparação seja geralmente com implantes igualmente minimamente rugosos. O processo de oxidação poderia alterar propriedades topográficas diferentes, o que raramente é investigado;
 - O aumento no desvio de altura de 0.7 para 4.7 μm resultou em resposta óssea mais forte para as superfícies TPS, mas nenhum efeito adicional foi observado pelo aumento da rugosidade para aproximadamente 10 μm . Pesquisas clínicas demonstraram algumas desvantagens com relação à reabsorção óssea marginal ao redor de implantes TPS quando comparado com implantes usinados.
-
-

Buser em 1991 avaliou a influência de diferentes características de superfície sobre a osseointegração de implantes dentários. Implantes cilíndricos com seis diferentes superfícies foram colocados na metáfise da tíbia e do fêmur em seis mini porcos. Após 3 e 6 semanas, os implantes com osso envolvente foram removidos e analisados em seções transversais não descalcificadas. O exame histológico revelou contato direto osso-implante para todas as amostras. As superfícies dos implantes tratadas com plasma de titânio demonstrou 30-40% de contato medio com o osso. A maior extensão da interface osso-implante foi observada nas superfícies jateadas com ataque ácido, com valores médios de 50-60%, e nos implantes revestidos de hidroxiapatita foi de 60-70%. Os autores concluíram que a extensão da interface osso-implante é positivamente correlacionada com um aumento da rugosidade da superfície do implante. Depois o mesmo autor em 2004 avaliou a justaposição do osso, com superfícies de titânio (modSLA) em comparação com um padrão de superfície de SLA, durante as fases iniciais de regeneração óssea. Implantes testes demonstraram uma porcentagem significativamente maior de contato osso-implante em comparação com controles em duas (49,30 vs 29,42%; $p = 0,017$) e quatro semanas (81,91 vs 66,57%; $p = 0,011$) de cicatrização. Às 8 semanas, foram observados resultados semelhantes. Concluiu-se que a superfície melhorada modSLA promoveu a justaposição do osso durante as fases iniciais de regeneração óssea.

Wennerberg em 1996, utilizou 318 implantes com rosca com um diâmetro de 3,7, comprimento de 6 a 7 mm e um campo de altura de 0,6 mm foram inseridos em 56 coelhos. Os implantes de diferentes graus de rugosidade de superfície foram produzidos por um processo de jateamento com partículas de tamanhode 25, 75, e 250 μm . Implantes usinados serviram como controles. A rugosidade da superfície do implante foi medida com o scanner a laser confocal. Após o tempo de implantação de 4 semanas, 12 semanas ou um ano, os animais foram sacrificados. Os implantes foram avaliados em relação ao torque de remoção, e percentagem de contacto entre o osso-implante. Os resultados dos experimentos com animais demonstraram, em geral, mais elevados torques de remoção e percentagens mais elevadas de contato osso-implante para implantes jateados com partículas de 25 e 75. Quando se compara a 25 e a 75, verificou-se que o jateamento de 75 mostrou uma maior fixação óssea.

Gotfredsen em 2000 comparou a ancoragem dos implantes de titânio, com diferentes rugosidade da superfície e topografia, e analisou histologicamente o osso peri-implantar após a remoção do implante. Os implantes torneados apresentaram os menores valores S_a e S_y , enquanto que as pontuações mais altas foram registradas para os implantes TPS. Os valores

correspondentes Sa e Sy dos implantes de jato de TiO₂ foram maiores quando um tamanho maior das partículas dos grãos do jateamento. A análise histológica das seções de 6, 9, e 12 semanas revelaram que fraturas ou rupturas estavam presentes no osso cortical marginal peri-implantar. Nessas seções, que representam o TPS e categorias de implantes jato-TiO₂, rupturas foram frequentemente encontrados na zona entre o osso velho e o novo osso formado, bem como dentro do osso recém-formado. O autor demonstrou que existe uma relação clara entre a rugosidade da superfície, descritas em valores Sa e na ancoragem do implante avaliada por medições RMT.

Buser em 2004 avaliou a justaposição do osso, com superfícies de titânio (modSLA) em comparação com um padrão de superfície de SLA, durante as fases iniciais de regeneração óssea. Implantes testes, demonstraram uma média percentual significativamente maior de contato osso-implante em comparação com controles em duas (49,30 vs 29,42%; $p = 0,017$) e quatro semanas (81,91 vs 66,57%; $p = 0,011$) de reparo. Às oito semanas, foram observados resultados semelhantes. Concluiu-se que a superfície melhorada modSLA promoveu a justaposição do osso durante as fases iniciais de regeneração óssea.

O aumento da formação óssea em implantes dentários osseointegrados pode ser conseguida por modificação de superfícies topograficamente melhoradas. Cooper et al. em 2006, com o objetivo de determinar o efeito da modificação de íon fluoreto de TiO₂ grit-blasted sobre a diferenciação osteoblástica e formação de osso interposto, com estudo paralelo *in vitro* e *in vivo*. Células-tronco mesenquimais humanas foram cultivadas em discos de titânio TiO₂ Blasted-grit, com e sem modificação íon fluoreto. Adesão celular, proliferação e expressão gênica osteoblástica(mRNAs que codificam colágeno 1, osteopontina, sialoproteína óssea, a osteocalcina e BMP-2). Após 24 horas, não houve diferença na adesão de células entre as superfícies testadas. Superfícies tratadas com íon fluoreto mantiveram maior proliferação celular, sialoproteína óssea e expressão de BMP-2. A modificação de Íon fluoreto da superfície grit-Blasted de TiO₂ reforça a diferenciação osteoblástica *in vitro* e formação de osso interposto *in vivo*.

Ganeles em 2008 avalio as taxas de sobrevivência e mudanças do nível ósseo em implantes com carga imediata e precoce com superfícies de implantes Straumann ou com superfície SLActive. O ponto inicial primário foi a mudança no nível da crista óssea desde a linha de base (colocação do implante) aos 12 meses; as variáveis secundárias foram as taxas de sobrevivência e de sucesso dos implantes. Um total de 383 implantes (197 imediatos e 186

precoce) foram colocados em 266 pacientes; 41,8% foram colocados em osso tipo III e IV. A mudança global do nível ósseo média do valor do baseline para 12 meses foi de $0,77 \pm 0,93$ mm ($0,90 \pm 0,90$ e $0,63 \pm 0,95$ mm nos grupos imediato e precoces, respectivamente ($p < 0,001$)). Os resultados demonstraram que os implantes Straumann com a superfície SLActive são seguros e previsíveis quando usado em procedimentos de carga imediata e precoce. Mesmo em osso de baixa qualidade, as taxas de sobrevivência eram comparáveis com os de carga convencional ou tardia.

Lang em 2011 avaliou a taxa e o grau de osseointegração na superfície de implantes quimicamente modificados (hidrofóbicas-SLA), moderadamente ásperas (hidrofílico-SLActive), e moderadamente ásperas apenas, durante fases precoces de reparo em um modelo humano. Todos os locais de dispositivos foram reparados sem intercorrências. Todas as superfícies de dispositivos foram parcialmente revestidas com remanescente ósseo. Uma fração significativa deste revestimento da matriz óssea tornou-se cada vez mais coberto com osso recém-formado. O processo de formação de osso novo já começou durante a primeira semana nas regiões trabecular e aumentou gradualmente até 42 dias. A percentagem de contato direto entre o osso recém formado e o implante foram após 2 e 4 semanas, sendo mais pronunciada nas superfícies de SLActive que em superfície de SLA (14,8% vs 12,2% e 48,3% vs 32,4%, respectivamente). Após 42 dias, estas diferenças não eram mais evidentes (61,6% vs 61,5%). Enquanto o reparo mostrou características semelhantes com reabsorção óssea e eventos aposicionais, ambas as superfícies, SLActive e SLA, entre 7 e 42 dias, o grau de osseointegração após 2 e 4 semanas, sendo superior para SLActive em comparação com a superfície SLA.

Liu et al. em 2013 estudaram as propriedades de superfície de quatro implantes dentários comumente utilizados (3i NanoTite™, Astra OsseoSpeed™, a Nobel Biocare TiUnite®, e Straumann SLActive®) para avaliar adesão celular. Para isso, utilizou MicroSpy profiler, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de dispersão de raios-X de energia, e Raman microespectroscopia. Células ósseas alveolares primárias de rato foram cultivadas na superfície dos implantes. Depois de cultura de 48 horas, com análise qualitativa das imagens por MEV para examinar a adesão celular, observou que o sistema Astra Straumann(superfície mais ásperas) apresentou maior adesão celular em áreas do lado, parte superior, e baixa da superfície do implante. O Nobel Biocare (que possui óxido de titânio)apresentou a menor adesão de células. Os autores concluíram que sistemas de

implantes têm diferenças nas propriedades da superfície, levando a diferentes resultados de adesão celular.

Klein em 2013 avaliou diferentes superfícies na adesão, proliferação e diferenciação de células osteogênicas específicas ao longo de um período de 7 dias. Superfícies TCPS e PT permaneceram um pouco mais imaturo, com divisão do fenótipo osteogênico (altas taxas de proliferação, baixos níveis de integrina, e baixa diferenciação celular osteogênica). Superfícies SLA e especialmente modSLA promoveram tanto a adesão de células, bem como, a maturação de precursores osteogênicos em osteoblastos pós-mitose. Durante as primeiras 48 horas, modSLA resultou em menores taxas de proliferação celular, mas exibiram altos níveis das integrinas, RUNX-2, COL, AP, e OC. Os resultados dos autores revelaram um forte efeito sinérgico entre rugosidade de escala submicrométrica e hidrofobicidade da superfície na adesão celular osteogênica inicial e na maturação.

Bang em 2014 avaliaram as atividades de diferenciação osteoblástica e osteoclástica em diferentes superfícies de titânio: jateada / ataque ácido (SLA), superfícies SLA hidrofílicas (modSLA) e titânio pré-tratamento (PT). A diferenciação dos osteoblastos foi avaliada por análise de fosfatase alcalina e coloração com Vermelho de Alizarina S. Expressão de proteínas ósseas, fosfatase alcalina (ALP), fator de transcrição relacionados com o RUNT 2 (Runx2), osteopontina (OPN) e osteocalcina (OCN). A diferenciação de osteoblastos na coloração de Vermelho de Alizarina S e ensaio de ALP, foi aumentada significativamente na superfície da modSLA. Quanto a atividade osteoclástica, osteoclastos diferenciados raramente existiam na superfície SLA e modSLA com anéis de actina. Promoção da proliferação osteoblástica após uma cultura de células de curto prazo pode ser responsável pela regeneração óssea estimulada implicando que o carregamento inicial pode ser possível. Além disso, o efeito anti-osteoclástico da superfície do modSLA pode contribuir para a manutenção do nível do osso marginal de implantes dentários, que implica na estabilidade ao longo prazo, o que poderia ser fornecida por tecnologia de superfície. A superfície modSLA não só permite a carga imediata, mas possivelmente diminui a perda óssea marginal durante a fase de manutenção.

Calvo-Guirado em 2015 comparou a influência de um tratamento de superfície sobre a osseointegração (2, 4 e 8 semanas) de 120 implantes dentários inseridos em 60 tíbias de coelhos. Quatro superfícies diferentes foram testadas: jato ácido-gravadas e deposição discreta de cristais(DCD) (grupo A); jato (grupo B); ácido-gravadas (grupo C) e jateadas e gravadas à

ácido (grupo D). Foi avaliado a estabilidade e nível ósseo no momento da inserção do implante e aos 14, 28 e 56 dias de reparo. O grupo A apresentou os valores iniciais mais alto e tardio do contato osso-implante (BIC), $40,8 \pm 2,3\%$ aos 14 dias diminuindo para $27,7 \pm 1,1\%$ depois de 28 dias e $39,4 \pm 1,4\%$ em 56 dias. Para o grupo B, os valores médios de BIC em 14, 28 e 56 dias foram $23,34 \pm 2,1$, $23,77 \pm 1,9$ e $29,47 \pm 1,7\%$, respectivamente. Grupo C apresentou um valor de $25,72 \pm 2,3\%$ depois de 14 dias de osseointegração, $34,92 \pm 2,2\%$ em 28 dias e $32,91 \pm 1,6\%$ em 56 dias. Grupo D apresentou um valor de BIC de $32 \pm 2,5\%$ aos 14 dias, $32,85 \pm 1,4\%$ aos 28 dias e $34,04 \pm 2,3\%$ aos 56 dias. Os autores não observaram diferenças estatísticas entre as diferentes superfícies.

Elias em 2015 comparou as propriedades de uma liga modificada Ti de Grau 4 (Ti G4 rígido) com os de Ti disponível comercialmente puro e ligas de Ti Grau 5. Ensaio mecânicos (tração, compressão, dureza de torque) e medições de rugosidade foram realizadas. Os ensaios clínicos foram utilizados para avaliar o comportamento biológico de implantes dentários feitos com Ti G4 rígido e Ti G4. Os resultados dos ensaios mecânicos demonstraram que a resistência mecânica de Ti modificado G4 é maior do que a de Ti G2, G4 e G5. Análise de microscopia eletrônica de varredura mostrou que modificações de Ti G4 depois de gravadas tem melhores características morfológicas que a superfície convencional de Ti G5.

2.2 Cultura de células sobre diferentes superfícies dos implantes

O efeito da rugosidade da superfície sobre a proliferação e diferenciação de osteoblastos, como também a síntese de proteínas foi examinada por Martin et al 1995. As células semelhantes a osteoblastos humanos (MG63) foram cultivadas em discos de titânio (Ti) que haviam sido preparados por cinco diferentes tratamentos. Todos os discos foram pré-tratados com ácido nítrico, ácido fluorídrico e lavados (PT). Os discos foram divididos em: polidas eletronicamente (PE); camada fina de areia, gravado com HCl e H₂SO₄ e lavados (FA); grosso jateado, gravado com HCl e H₂SO₄, e lavados (CA); ou Ti- plasma-sprayed (TPS). Com base na análise da superfície, as cinco superfícies de Ti diferentes foram classificados em ordem de mais lisa para mais rugosa: PE, PT, FA, CA, e TPS. Uma camada de TiO₂ foi encontrado em todas as superfícies que variaram em espessura de 100 Å no grupo mais liso para 300 Å no mais rugoso. O número de células foi reduzido sobre as superfícies de TPS e aumentado nas superfícies de PE, enquanto o número de células nas outras superfícies

era equivalente ao controle sem disco. A timidina foi inversamente relacionada à rugosidade superficial, como também com a atividade da fosfatase alcalina, com exceção das células cultivadas em CA. Entretanto, a atividade enzimática na camada celular só foi diminuída em culturas cultivadas nas superfícies tratadas por FA e TPS. Uma correlação direta entre a rugosidade da superfície e produção de RNA e CDP foi encontrado. A rugosidade superficial não teve efeito aparente sobre a produção de NCP. A síntese de proteoglicanas pelas células foi inibida em todas as superfícies estudadas, com a maior inibição observada nos grupos de CA e PE. Estes resultados demonstram que a rugosidade de superfície modifica a proliferação e diferenciação dos osteoblastos, e produção de matriz óssea *in vitro*. Os resultados também sugerem que a rugosidade da superfície do implante pode desempenhar um papel na determinação da expressão fenotípica das células *in vivo*.

Wennerberg et al. 1998, avaliaram superfícies diferentes. Quarenta implantes em forma de parafuso foram divididos em quatro grupos (10 cada). Cada parafuso foi preparado com duas topografias diferentes. Após 12 semanas, todos os parafusos em osso de coelho foram avaliadas histomorfometricamente. Superfícies jateadas demonstraram mais osso em contato com a superfície do implante comparado com as superfícies torneadas. A maior quantidade óssea em contato próximo com a superfície do implante foi encontrado na superfície jateada com partículas de tamanho de 75 microns, caracterizada numericamente com um desvio médio altura (Sa) de 1,4 microns, um comprimento de onda média (Scx) de 11,6 microns e uma relação de área de superfície desenvolvida (SDR) de 1,5.

Anselme et al. (1999) realizaram um estudo para observar a proliferação e adesão de células osteoblásticas de rato (MC3T3-E1) e humana em amostras de liga de titânio Ti6Al4V com rugosidades variadas na superfície. Superfícies mecanicamente ou manualmente polidas foram preparadas para produzir sulcos de polimento residuais bem orientados ou não, respectivamente. Houve correlação negativa entre a rugosidade superficial e a proliferação e adesão celular. A micro-CT para microanálise química mostrou perturbação da superfície completa da composição da liga do elemento de Ti6Al4V jateada de areia após o tratamento da superfície. Uma camada AlOx (composto de alumínio oxidado) enriquecido foi observado na superfície das amostras, o que poderia levar à suspeita de que o efeito concomitante da amplitude da rugosidade da superfície e concentração do AlOx tem um efeito sobre a proliferação e adesão das células osteoblásticas. Estes resultados mostraram a importância da análise química da superfície depois de qualquer tratamento superficial dos implantes à base de titânio antes de utilização biológica.

Culturas primárias de células semelhantes a osteoblastos, derivadas a partir de osso mandibular humano, foram usadas por Mustafa et al. 2001, para examinar o efeito da variação da rugosidade da superfície no material de implantes de titânio, na fixação celular, proliferação e diferenciação. Os autores determinaram que a proliferação e diferenciação de células derivadas de osso mandibular humano é aumentada pela rugosidade da superfície do implante de titânio. No entanto, o aumento do tamanho das partículas de jateamento a 300 microM não aumenta a adesão inicial das células em comparação com superfícies torneadas.

Vários estudos têm mostrado que, em tecido mole, a orientação da topografia da superfície afeta a resposta celular. No entanto, a resposta do tecido duro não é totalmente compreendida. Hallgreen em 2001 realizou um estudo para determinar se a orientação da microestrutura de superfícies de implantes influencia no reparo ósseo em coelhos. Quarenta implantes cilíndricos foram preparados com uma orientação constante da microestrutura e investigados *in vivo*. A análise topográfica apresentou uma orientação clara na superfície do implante, sendo na estrutura de superfície mais áspera, foi encontrado ranhuras orientadas verticalmente que horizontalmente. A análise histomorfométrica não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre as ranhuras horizontais ou verticais dos implantes, referentes ao contato osso-implante ou a quantidade de área de osso ao redor do implante.

Boyan_a et al. (2003) realizaram cultura de células osteoblásticas de linhagem de osteossarcoma humano (MG63), da calvária de fetos de ratos (FRC), do tipo osteócitos de camundongos (MLO-Y4) e osteoblastos humanos (NHOb) sobre discos de titânio. Foram utilizadas superfície lisa (usinados; $Ra < 0.02 \mu m$); mista (jateados e condicionados com ácido-SLA; $Ra = 4 \mu m$) e rugosa (jateados com spray de titânio-TPS; $Ra = 5 \mu m$). Como controle negativo, as células foram cultivadas sem o disco. O objetivo foi testar a capacidade de linhagens osteoblásticas em sintetizar fatores que possam favorecer a osteogênese e atividade de osteoclástica. Todos os experimentos foram realizados em sextuplicatas e repetidos duas vezes para garantir a validade das observações. Houve expressão aumentada de TGF- $\beta 1$, PGE₂ e NO com todas as linhagens celulares cultivadas sobre as superfícies TPS e SLA. Houve aumento da resposta aos hormônios esteróides. A inibição de produção das prostaglandinas reduziu os efeitos da microtopografia de superfície. Tanto a COX-1 constitucional quanto a COX-2 induzível exerceram papéis de influência na inibição específica de cada enzima. A sinalização de integrina foi também importante, já que o anticorpo anti-beta-1 integrina favoreceu a diferenciação de osteoblastos. As células cultivadas sobre SLA e TPS também demonstraram níveis elevados de osteoprotegerina

(OPG) no meio condicionado, os quais estavam relacionados com aumento no mRNA de OPG. Por outro lado, os mRNAs do ligante RANK estavam presentes em baixos níveis, sem detecção de RANKL solúvel no meio condicionado. Esses achados sugeriram que o crescimento de células sobre superfícies microrrugosas resultaram em células com características fenotípicas de osteoblastos, com produção de fatores locais e hormônios que mantinham e sustentavam esse fenótipo, ao mesmo tempo em que diminuía a atividade e formação de osteoclastos.

Segundo Boyan em 2003, osteoblastos respondem as micro características arquitetônicas de seu substrato. Em superfícies lisas as células aderiram e proliferaram, com apresentação relativamente baixa de marcadores de diferenciação em culturas em monocamada, mesmo quando confluentes. Quando cultivadas em superfícies microrrugosas de Ti, com uma rugosidade média (Ra) de 4-7µm, a proliferação é reduzida mas a diferenciação é aumentada e em alguns casos é sinérgico com os efeitos de microtopografia superfície. Além disso, as células sobre substratos microrugosos Ti, formam mais hidroxiapatita que as células cultivadas em superfícies lisas. Os osteoblastos também respondem a fatores de crescimento e citocinas em um modo dependente da superfície. Em superfícies mais ásperas, os efeitos de fatores reguladores, como 1α, 25 (OH) 2D3 ou 17β-estradiol são realçados. A resposta à superfície é mediada por integrinas sinalizadas pelas células através de muitos mecanismos como fatores de crescimento. Os estudos que utilizam superfícies de PEG-modificada, indicam que o aumento da diferenciação pode estar relacionada com uma ligação com a superfície. Quando os osteoblastos são cultivados em superfícies com produtos químicos ou microarquiteturas que reduzem adesão e proliferação celular, aumentou a diferenciação de células e tendem a aumentar a produção de fatores, como o TGF-β1, que promovem a osteogênese enquanto diminui a atividade osteoclástica. Assim, em superfícies microrrugosas de Ti, osteoblastos criam um microambiente compatível à formação de novo osso

Jayaraman et al. em 2004 investigaram a proliferação de células osteoblásticas obtidas a partir de periosteó de cabra sobre implantes rugosos com superfícies tratadas por meio de jateamento e condicionamento ácido sobre implantes com superfície sulcada experimentalmente. Os implantes foram cultivados com osteoblastos e mantidos por período de 1 a 7 dias. A expressão de fibronectina e osteonectina foram investigadas. A superfície sulcada permitiu melhor suporte para a adesão e proliferação de células osteoblásticas que nas superfícies rugosas. Além disso, as células osteoblásticas posicionadas em superfícies

sulcadas exibiram forte marcação para fibronectina e extensões citoplasmáticas junto com expressão intensa de osteonectina, sugerindo que os sulcos ofereciam melhor adesão e proliferação celular do que outras superfícies rugosas estudadas.

Segundo Lossdörfer et al 2004, superfícies de titânio do implante com microtopografias rugosas apresentam um aumento da força de retirada *in vivo* sugerindo aumento no contato osso-implante. Isto é suportado por estudos *in vitro* que mostram que quando a microrugosidade da superfície aumenta, a proliferação dos osteoblastos diminui ao passo que aumenta sua diferenciação. A diferenciação é ainda mais reforçada nas superfícies microrugosas por fatores estimuladores de osteogênese incluindo 1alfa, 25 (OH) 2D3. Os níveis de PGE2 e TGF-beta1 são aumentados em culturas cultivadas em microtopografias rugosas. Este efeito de superfície é aumentada sinergicamente, por tratamento de 1alfa, 25 (OH) 2D3. PGE2 e TGF-beta1 regulam osteoclastos bem como osteoblastos, sugerindo que a microtopografia da superfície pode modular a liberação de outros fatores por osteoblastos que regulam osteoclastos. Para testar esta hipótese, os autores examinaram os efeitos da micro-arquitetura do substrato na produção de osteoprotegerina (OPG) e ativador do receptor do factor nuclear kappa B ligando (RANKL), os quais foram identificados como um sistema regulador chave da remodelação óssea, além da produção de 1alfa, 25 (OH) 2D3, que regula a diferenciação dos osteoblastos e osteoclastogênese. Células semelhantes a osteoblastos MG63 foram cultivadas em cultura celular sobre discos de titânio com diferentes microtopografia: PT (Ra <0,2 microm), SLA (Ra = 4 microm) e TPS (Ra = 5 microm). O número de células foi reduzido nas superfícies SLA e TPS, e o 1alfa, 25 (OH) 2D3 reduz ainda mais. Os níveis de OPG mRNA aumentaram em superfícies mais rugosas e o tratamento de 1alfa 25 (OH) 2D3 provocou um aumento sinérgico maior. Assim, em superfícies com microtopografias rugosas, os osteoblastos secretaram mais fatores que aumentam a sua diferenciação, enquanto diminui a formação e a atividade dos osteoclastos.

Análise de ângulo de contato dinâmico foi utilizada por Rupp em 2004 para investigar mudanças dependentes do tempo na molhabilidade de modificações de implantes de titânio jateados e ácido-gravadas, durante o seu primeiro contato com sistemas aquosos, em comparação com uma superfície de referência macroestruturada. As superfícies de Ti microestruturadas foram consideradas inicialmente hidrofóbicas. Rugosidade espacial e os parâmetros híbridos (ângulo de contato) poderiam descrever características topográficas interferindo com a molhabilidade dinâmica significativamente melhor do que os parâmetros de altura da rugosidade. Os resultados sugerem que a microestruturização influencia

fortemente a molhabilidade dinâmica das superfícies de implantes de Ti durante o contato inicial e a resposta biológica de adsorção de proteína do plasma. As superfícies microestruturadas, uma vez que na configuração totalmente molhável, pode melhorar o contato inicial com o tecido do hospedeiro após a implantação, devido ao aumento drasticamente da hidrofília.

Sammons et al. em 2005 comparam sete implantes comercialmente disponíveis com superfícies *plasma-spray*, *grit-blasted* e/ou com ataque ácido, lisa e usinada e de titânio anodizado. Dois métodos foram usados para comparar o comportamento celular: 1. Teste de proliferação celular em quatro estágios diferentes de adesão por meio de MEV; 2. Implantes colocados dentro de sacos de rede de nylon em contato com fragmentos ósseos de calvária de ratos por 2 e 4 semanas. As superfícies combinando *grit-blasting* e condicionamento ácido mostraram taxas mais elevadas de proliferação celular. Morfologias celulares mais diferenciadas foram observadas nos dois testes realizados, com migração de células sobre todas as superfícies no segundo teste. Camadas multicelulares com matriz extracelular estavam presentes entre as camadas e a superfície dos materiais depois de 2 semanas. Após 4 semanas, as camadas celulares estavam mais consolidadas, e a microestrutura estava coberta por camadas de células e matriz extracelular, com formação de tecido mineralizado. Os resultados indicaram que superfícies mais rugosas favorecem a proliferação celular.

Jarmar et al., em 2008, avaliaram as características de superfície de diferentes implantes disponíveis comercialmente por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), feixe de íons e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foram investigadas amostras dos implante: TiUnite (Nobel Biocare) com tratamento de superfície por meio de modificação anódica; HA (Nobel Biocare) com tratamento spray de plasma de HA; OsseoSpeed (Astra) com tratamento por jateamento e condicionamento com ácido fluorídrico diluído; SLA (Straumann) com tratamento por meio de jateamento e condicionamento ácido; Branemark Integration, superfícies apenas usinadas. As análises realizadas demonstraram que os implantes TiUnite apresentam $Sa = 1.55 \pm 0.01$, espessura da camada superficial de 2 μm contendo óxido de titânio amorfo, TiO_2 e fósforo. Os implantes HA apresentaram $Sa = 3.29 \pm 1.15$, espessura de camada superficial $> 5 \mu m$ com presença de HA amorfa e cristalina. Os implantes OsseoSpeed apresentaram $Sa = 1.82 \pm 0.12$, com espessura de camada superficial de 0.5-1 μm contendo TiO_2 (anatase + rutila) ou 0.01 μm com TiO_2 amorfo. Os implantes SLA apresentaram $Sa = 1.98 \pm 0.08$, espessura de camada superfície não detectável contendo TiH_x .

Os implantes Branemark Integration apresentaram $Sa = 1.53 \pm 0.05$, espessura de superfície $0.01 \mu m$ e presença de TiO_2 (rutila).

Em 2008, Le Guehennec et al. compararam o comportamento de células osteoblásticas MC3T3 sobre diferentes superfícies de implantes: polido (Smooth-Ti), jateado por alumina (Alumina-Ti) ou com fosfato de cálcio bifásico (BCP-Ti) e jateado e tratado com ácido (SLA). As análises por meio de MEV e perfilometria mostraram microtopografias distintas, com o grupo BCP-Ti apresentando maior rugosidade ($Ra = 2.51$). A hidrofília e energia de superfície foram determinadas em diferentes substratos por medidas de ângulo de contato dinâmico. A superfície mais hidrofílica foi a de Alumínio-Ti, enquanto a SLA era a superfície mais hidrofóbica. As superfícies de titânio estavam oxidadas como TiO_2 e poluídas por contaminantes de carbono, conforme determinado por XPS. As amostras de alumina-Ti também exibiram picos de alumínio resultantes do jateamento. Os discos de BCP-Ti continham traços de cálcio e fósforo. As células osteoblásticas aderiram, espalharam e se proliferaram sobre os substratos. Depois de dois dias, as superfícies SLA e BCP-Ti estavam recobertas por camada de células osteoblásticas. Em maior aumento, as células exibem extensões citoplasmáticas e filópodes. Comparativamente ao controle, a viabilidade celular sobre o implante de titânio de superfície lisa foi semelhante, inferior para os implantes de Alumina-Ti e superior com os grupos SLA e BCP-Ti. A atividade de fosfatase alcalina estava aumentada na cultura de forma tempo-dependente, independente do substrato. Esses achados sugeriram que a superfície jateada por BCP resulta em rugosidade superficial sem contaminantes de superfície.

Mendoza et al. (2009) utilizaram discos de titânio comercialmente puro (cpTi) grau IV (6,0 mm x 1,0 mm), divididos em três grupos para avaliar a adesão de células mesenquimais humanas induzidas à diferenciação osteoblástica cultivadas sobre esses discos. Os grupos foram divididos de acordo com o tratamento de superfície: usinados (grupo U), usinados e subsequentemente tratados com ataque ácido (grupo Ac) ou usinados, jateados e condicionados com ataque ácido (grupo J/Ac). Foram avaliados a expressão gênica fosfatase alcalina-ALP, Sialoproteína Óssea-BSP, e Runx2, após 7 e 21 dias através de PCR em tempo real, enquanto a formação de nódulos mineralizados *in vitro* foi investigada por coloração com alizarina vermelha. Observou-se aumento relativo nos níveis de expressão dos genes ALP, BSP e Runx2 para a superfície com J/Ac quando comparada com as superfícies U e Ac. Após 21 dias a expressão de ALP estava 80 vezes maior na superfície J/Ac e o aumento no nível de BSP foi de 25 vezes. Após 35 dias a área mineralizada foi de 18%, 71% e 80%, para

as superfícies U, Ac e J/Ac, respectivamente. Estes resultados sugerem que o jateamento da superfície previamente ao ataque ácido permitiu um maior nível de expressão de genes relacionados à cascata de diferenciação do tecido ósseo e formação de nódulos de mineralização *in vitro*, podendo levar a uma maior e melhor resposta de osseointegração destas superfícies.

No mesmo ano, Mendonça e colaboradores investigaram a influencia de superfícies de implantes tratados em nanoescala na diferenciação de osteoblastos. Os discos de titânio foram preparados com revestimentos derivados de sol-gel e caracterizados por MEV, microscopia de força atômica e XPS. Células tronco mesenquimais (CTMs) foram cultivadas sobre os discos de titânio por 3-28 dias. Foram medidos os níveis de atividade de fosfatase alcalina, mRNAs de sialoproteína óssea (BSP), Runx2, osteonectina (OCN), OPG e OSX e painel de 76 genes relacionados à osteogênese. A avaliação topográfica e química confirmou as características de nanoescala comparadas aos implantes usinados (M) e condicionados com ácido (Ac). Aos 14 dias, os níveis de mRNA estavam aumentados para Anatase (An), Rutila (Ru), Alumina (Al) e Zircônia (Zr) (2x, 3.5x, 4x e 3x, respectivamente). A expressão de OSX nos grupos M e Ac foram semelhantes ao baseline. Aos 14 e 28 dias a expressão relativa de mRNA de BSP foi significativamente sobrerregulada para todas as superfícies em nanoescala comparativamente às usinadas. A resposta aumentada de células aderidas a superfícies de implantes revestidas por nanoestrutura foi ilustrada por aumento na expressão aumentada de OSX e BSP. Além disso, as superfícies nanoestruturadas produzidas por óxido de alumínio aumentaram significativamente a expressão de gene de diferenciação de osteoblastos das CTM, sugerindo que substratos de implantes de titânio em nanoescala podem melhorar a osseointegração por alterar a resposta das células aderidas.

Alves & Wassall em 2009 avaliaram a biocompatibilidade superficial observando adesão, morfologia celular e proliferação de células semelhantes a osteoblastos, cultivados em implante dentário de titânio comercialmente disponível (Titamax Liso, Neodent, Curitiba, PR, Brasil). As amostras de implantes foram imersos em suspensão de células de tipo osteoblastica por um período de 24, 48 e 72 horas Com base na análise de superfície, as células osteoblásticas aderiram à superfície usinada, após 24 horas em cultura. Em 48 horas, as células se espalharam sobre a superfície do implante, e após 72 horas uma proliferação de células com corpos grandes e planos foi observada sobre a superfície usinada do implante. os resultados demonstram que a superfície de titânio usinada é biocompatível, uma vez que

permitiu a adesão e proliferação de células semelhantes a osteoblastos, além de preservar a integridade da célula e as características morfológicas.

Wennerberg & Albrektsson (2009) avaliaram e compararam superfícies modificadas em escala nanométrica de microimplantes experimentais de TiO₂ com microimplantes não modificados, em relação à interação do tecido da mucosa oral humana, avaliada por microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, com o objetivo de caracterizar a resposta inflamatória e o nível de reabsorção óssea marginal. Para tanto, realizaram estudo randomizado envolvendo 15 voluntários que receberam os dois tipos de implantes a serem testados. A comparação entre dois microimplantes mostrou leve eritema e liberação de exsudato. Os tecidos ao redor dos implantes testados estavam clinicamente saudáveis. Houve 72% de contato com o pilar do mini-implante no grupo teste e 48% no grupo controle ($p = 0.0268$). Não houve diferença estatisticamente significativa em outras variáveis histológicas. A perda de osso marginal após 14 semanas foi de 0.5 mm para o grupo teste ($n = 11$) e de 1.7 mm para o grupo controle ($n = 9$; $p = 0.0248$). Esses resultados sugeriram que a incorporação de tratamento por nanotecnologia apresenta benefícios clínicos no processo inicial de reparo dos tecidos após a instalação do implante, aumentando a aderência de tecido mole aos mesmos e possivelmente diminuindo a reabsorção óssea.

Olivares-Navarrete em 2010 avaliou as respostas de CTMs humanas nas propriedades de superfície ao substrato e examinou os mecanismos subjacentes envolvidos. CTMs exibiram características de osteoblastos (fosfatase alcalina, RUNX2 e osteocalcina), quando cultivada em microestruturas de Ti; este efeito foi mais forte com o aumento da hidrofília. Fatores produzidos pelos osteoblastos cultivados em microestruturas de Ti foram suficientes para induzir a diferenciação das CTMs em co-cultura a osteoblastos. Estudos mostraram que isso foi devido à sinalização via integrinas $\alpha 2 \beta 1$ em osteoblastos na superfície do substrato e ação parácrina de Dkk2 secretada. Assim, MSCs humanas são sensíveis a propriedades dos substrato, que induzem a diferenciação osteoblástica. Os osteoblastos interagem com estas propriedades de superfície através de $\alpha 2 \beta 1$ e secretam Dkk2, que atua sobre as CTMs.

Em 2010, Mendonça et al, considerando que as superfícies nanoestruturadas podem modular a resposta celular, investigaram a expressão diferencial de genes da cascata de diferenciação de osteoblastos em função de diferentes materiais e superfícies de implantes osseointegrados *in vitro* e *in vivo*, visando possível redução no tempo necessário à osseointegração. Foram utilizados discos de titânio comercialmente puro grau IV de 6.0 x

1.0mm da Neodent Implantes Osteointegráveis (Curitiba, PR, Brasil) com os seguintes tratamentos de superfície: usinado (L), com ataque ácido (Ac), revestido com óxido de titânio – forma cristalina anatase (A); revestido com óxido de titânio – forma cristalina rutilo (R); revestido com óxido de alumínio (Al) e revestido com óxido de zircônia (Zr). A topografia de superfície foi investigada por MEV em aumentos de até 100.000x. A rugosidade foi investigada em microscópio de força atômica e a composição química por meio de EDS. A avaliação da biocompatibilidade *in vivo* foi feita pela instalação de implantes em tibia de ratos. Cada animal recebeu um ou dois implantes (4.0 x 1.6 mm) de cada superfície em cada tibia. Os animais foram sacrificados após 3, 7, 14, 21 e 56 dias. Nos períodos de 14, 21 e 56 dias foi investigada a resistência de remoção ao torque dos implantes por meio de torquímetro digital (6 implantes/grupo em cada período de avaliação). Os níveis de expressão do gene de fosfatase alcalina foi elevado para o grupo Al, com expressão 5.2x maior após 3 dias e 3.8x após 14 dias comparativamente à superfície usinada, que apresentou valores semelhantes aos implantes tratados por ácido. Os implantes nanoestruturados A, R e Zr também mostraram aumentos na expressão de BSP superiores aos controles, porém inferiores aos implantes Al. Houve baixa expressão de mRNA de BSP nos períodos iniciais de observação, porém com alta expressão após 14 dias para as superfícies AL e Zr, sem diferenças entre os grupos U e Ac. O torque de remoção aumentou de forma tempo-dependente e foi significativamente maior aos 56 dias para as superfícies nanoestruturadas. A análise histomorfométrica demonstrou maior contato osso-implante nas superfícies nanoestruturadas, com mais de 50% de contato aos 56 dias, enquanto a superfície A apresentou aproximadamente 40% de contato e a U de aproximadamente 30%. Esses achados sugeriram que o tratamento proposto afetou a expressão gênica específica de células ósseas..

Yamano et al. (2011) utilizaram discos de zircônia (Zr) e titânio (Ti) com diferentes tratamentos de superfície com a divisão da amostra em quatro grupos: (Zr-S)- zircônia de superfície lisa, (Zr-R)- zircônia de superfície rugosa, (Ti-S)- titânio de superfície lisa e (Ti-R)- titânio de superfície rugosa foram utilizadas. A rugosidade superficial foi investigada por meio de microscopia de força atômica. A morfologia dos fibroblastos gengivais humanos aderidos sobre os discos foi examinada por meio de microscopia eletrônica de varredura, enquanto que a atividade de proliferação celular foi investigada por ensaio de MTT. Os níveis de expressão gênica de colágeno e integrina foram investigados por meio de PCR em tempo real. A maior rugosidade superficial foi observada nos discos Ti-R, seguido por Zr-R, Ti-S e Zr-S. As células cultivadas sobre os discos de Ti-S e Zr-S estavam mais alinhadas com as

irregularidades superficiais em períodos mais prolongados de observação. As células cultivadas sobre os discos de Zr-S apresentaram o mais fraco espalhamento em comparação com as outras superfícies, após 3 horas de cultura. As células proliferaram em taxa significativamente mais rápida na superfície de Zr-S do que nas outras superfícies. Houve expressão gênica de integrina $\alpha 2$ após 3 horas, integrina- $\alpha 5$ e colágeno tipo I após 48 horas mais significativa sobre as superfícies de Zr-S. Por outro lado, a expressão de integrinas $-\beta 1$ e $-\beta 3$ e colágeno do tipo III foi significativamente diminuída nos discos de Zr-S após 1 hora.

Heo et al. (2011) investigaram a resposta de CTMs de ligamento periodontal cultivadas sobre discos de titânio usinados, jateados com partículas de Al_2O_3 de 75 e 125 μm e anodizados. Os resultados demonstraram que a taxa de proliferação celular foi maior nos discos de titânio jateados com partículas de Al_2O_3 de 75 μm , bem como maior expressão de osteocalcina foi observada nas superfícies jateadas, independentemente do tamanho das partículas. Houve diminuição na expressão de colágeno tipo I em períodos de observação mais tardios (6 dias) em todos os grupos.

Lavenus et al. em 2011, investigaram a adesão, proliferação e diferenciação de células tronco mesenquimais humanas, fibroblastos gengivais e células osteoblásticas sobre superfícies de poliestireno ou TCPS (controle), vidro e titânio. As propriedades dos substratos foram cuidadosamente avaliadas por meio de microscopia de força atômica, espectroscopia fotoeletrônica por raios-X (XPS), medidas de ângulo de contato e potencial zeta. A adesão dos três tipos de células foi comparada nos diferentes substratos. O número de células aderentes, morfologia celular e densidade dos pontos focais foram determinados por meio de sistema de análise de imagens próprias baseadas na marcação do núcleo, actina e vinculina. A influência das superfícies na diferenciação osteogênica de CTMs, fibroblastos e linhagem osteoblásticas foram também investigadas por meio da mensuração da atividade de fosfatase alcalina e marcação da mineralização com vermelho de alizarina. Para o teste de proliferação celular, as células foram cultivadas nos diferentes substratos por 1, 2, 4, 8 e 16 dias. O meio foi trocado a cada 2 dias. Ao final de cada período de análise, as células foram tripsinizadas e contadas em hemocitômetro ($n=4$ poços/grupo). Para análise de atividade de fosfatase alcalina e ensaio com alizarina vermelha, as células foram cultivadas sobre os discos em meio convencional e osteogênico (suplementado com 10mM de β -glicerofosfato, 0.2 mM de ácido ascórbico e $10^{-8}M$ de dexametasona – Sigma). A atividade de fosfatase alcalina foi determinada nos períodos de 7, 14 e 21 dias da cultura e a marcação com alizarina vermelha foi realizada nos períodos de 14, 21 e 28 dias. Apesar do substrato, as células tronco

mesenquimais e osteoblásticas apresentam formato de galho. Os fibroblastos gengivais exibiram maior número de pontos focais no Ti do que nos demais substratos. A quantificação de alizarina vermelha indicou que as CTM e osteoblastos eram mais diferenciados no TCPS do que no Ti e no vidro. As propriedades de superfície dos substratos, tais como rugosidade, molhabilidade e composição química modularam o comportamento das células.

Ainda neste ano, Mendonça et al. investigaram os efeitos da topografia de superfície dos implantes na síntese de colágeno por CTMs cultivadas sobre discos de titânio (20.0 x 1.0 mm) de superfícies lisas ou rugosas por períodos de 0 a 42. A adesão e distribuição celular foram investigadas pela incubação das células com anticorpo faloidina conjugado com Texas-Red. Os níveis de mRNA de colágeno 1 α 1 foram investigados por meio de PCR quantitativo em tempo real e por genes modificadores do colágeno, como hidroxilases prolil (PHs), lisil oxidases (LOXs) e lisil hidroxilases (LHs). A osteogênese foi investigada pela expressão de genes específicos para osteoblastos e pela marcação da mineralização por vermelho de alizarina. As camadas celulares associadas à matriz e conteúdo de colágeno foram determinadas por análise de aminoácidos. No período de 4 horas, 100% das células estavam achatadas nas duas superfícies, entretanto, as células sobre as superfícies lisas tinham formato semelhante a fibroblastos, enquanto que as células cultivadas sobre superfície rugosa não tinham longo eixo definido. Os níveis de mRNA de PH, LH e LOX, na sua maioria, foram maiores nas superfícies rugosas depois de 3 dias. A área mineralizada também foi maior sobre superfícies rugosas nos períodos de 28 e 42 dias. O conteúdo de colágeno (percentual de proteína total) também foi significativamente ($p < .05$) maior sobre superfícies rugosas comparadas a superfícies lisas aos 28 (36% vs. 26%) e 42 (46% vs. 29%), sugerindo que a topografia de superfície rugosa modula positivamente a biossíntese de colágeno e o acúmulo e expressão de genes associados com a ligação cruzada de colágeno em CTM aderentes. A biossíntese alterada de matriz extracelular ricas em colágeno adjacente aos implantes osseointegrados pode influenciar as propriedades biomecânicas dos mesmos.

Modificações de micro superfície e nanoestruturais de implantes dentais e ortopédicos têm se mostrado promissores *in vitro*, *in vivo* e nos resultados clínicos. A molhabilidade da superfície também foi sugerida para desempenhar um papel importante na diferenciação de osteoblastos e osseointegração. No estudo de Gittens et al 2013 análises da molhabilidade (análise óptica de gota, análise ambiental microscópica eletrônica de varredura, e a técnica Wilhelmy) indicaram respostas estáticas hidrofóbicos para gotas de água depositadas sobre

microrugosidades e espécimes micro/nanoestruturados, enquanto as respostas hidrofílicas foram observados com análises dinâmicas de espécimes micro/nanoestruturados. A maturação e fator local de produção de células MG63 osteoblastos humanos imaturos foi sinergicamente influenciado por nanoestruturas sobreposta a superfícies de titânio(Ti) com microrugosidades. Em contraste, as CTMs cultivadas em superfícies micro / nanoestruturados, na ausência de fatores exógenos solúveis exibiram diferenciação osteoblástica menos proeminentes e de fator local, em comparação com culturas em microrugosidade de Ti não modificadas.

Pivodova em 2013, para estudar os efeitos das diferentes superfícies de titânio quimicamente modificados sobre a proliferação, diferenciação, adesão, e apoptose de células osteoblásticas SaOs-2. Seis diferentes materiais de titânio foram testados e comparados uns com outros: (1) Polido; (2) sem polimento; (3) sem polimento e gravado-alcálico; (4) sem polimento, areia, ácido e gravado-alcálico; (5) sem polimento e revestido com nitrato de zircônio; e (6) sem polimento, areia, e ácido-gravadas. A produção de fosfatase alcalina (ALP), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), metaloproteinase de matriz-2, e a expressão de proteínas de adesão (integrina $\alpha 3 \beta 1$, vinculina) foram avaliadas utilizando o método ELISA. Finalmente, a apoptose das células foi analisada por citometria de fluxo. As diferenças mais significativas foram encontradas para superfícies com jateamento e ácido sem polimento e discos de titânio com gravado alcálico quando comparadas com discos de titânio sem lustro apenas. A produção de TNF- α foi diminuída após 24 horas, tal como foi a produção de ALP após 72 horas. Em contraste, a expressão da integrina $\alpha 3 \beta 1$ foi aumentada após 6 horas. Nenhum dos discos de titânio demonstrou um efeito apoptótico em células. Este estudo demonstrou que os tratamentos de superfície físicas (tais como a rugosidade da superfície) têm um papel mais importante do que modificações químicas. Em geral, modificações químicas, tais como condicionamento ácido e alcálico pode afetar a molhabilidade das superfícies de titânio, fazendo uma superfície hidrófila ou hidrófoba de acordo com a modificação. Os autores concluíram que a ligação de células é melhor em superfícies hidrófilas, ao passo que as mesmas podem diminuir ligeiramente a expressão de atividade de ALP.

Mendonça em 2013 avaliou o efeito de diferentes superfícies de implantes na diferenciação de CTMs em osteoblastos. Uma nova superfície de implante (Acqua) foi comparada com a superfície NeoPoros. As CTMs foram cultivadas em discos de titânio preparados com duas superfícies, e experimentos diferentes foram realizados para avaliar a viabilidade celular, a proliferação, a atividade de fosfatase alcalina, a mineralização e a

expressão dos genes relacionados aos osteoblastos. Além disso, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de fotoelétrons de raio X foram feitas para avaliar a composição química e a topografia das superfícies. Após três e sete dias, a superfície Acqua mostrou níveis mais altos de proliferação celular, quando comparada com a superfície NeoPoros ($p < 0,05$). A atividade da fosfatase alcalina foi seis vezes maior na superfície Acqua após 14 dias de cultura celular ($p < 0,05$). Além disso, a quantidade de cálcio depositado nas superfícies, devido ao processo de mineralização, foi o dobro na superfície Acqua após 14 e 28 dias ($p < 0,05$). Para a análise da expressão gênica, os níveis de mRNA do genes da fosfatase alcalina (ALP) e sialoproteína óssea (BSP) foram maiores para Acqua aos três, sete e 14 dias, em comparação com a superfície NeoPoros. Uma maior expressão de genes marcadores de osteoblastos, bem como maior atividade de fosfatase alcalina e teor de cálcio, foram observados para a superfície Acqua.

Em 2013 Soares et al para avaliar o desempenho biológico de ligas de titânio grau IV sob diferentes tratamentos de superfície: G1, jateamento e corrosão (NeoPoros, NEODENT); G2, a superfície com aumento de molhabilidade (Acqua - NEODENT) sobre a resposta de diferenciação preliminar e maturação celular. As células osteoblásticas imortalizadas foram plaqueadas em discos de G1 e G2 titânio. Sem disco foi utilizado como grupo de controle (C). A viabilidade celular foi avaliada através da medição da atividade mitocondrial (MTT) a fixação das células foi realizada utilizando a exclusão de azul de triptano, a proteína total no soro e a normalização da fosfatase alcalina foi realizada em 4, 7 e 14 dias. As superfícies testadas apresentam comportamento diferente na dosagem de normalização da fosfatase alcalina mostrando que o G2 está mais associada com a indução de processo de diferenciação celular e que G1 é mais relacionado com o processo de mineralização.

Rosa et al em 2013 caracterizaram a superfície dos implantes de empresas nacionais por interferometria de luz e avaliaram o grau de controle do processo de tratamento de superfície. As superfícies dos implantes foram analisados nas partes superiores, planos e ângulos das roscas, totalizando nove medições para cada unidade. Os implantes examinados apresentaram um desvio de altura média de menos de 1 μ m, a qual foi considerada minimamente áspera, exceto os implante da SIN-SW (1,01 mm) e no desenho do Vulcano Activos (1,26 mm). Os valores da ampliação da superfície variou consideravelmente em relação a referência de implante, com valores inferiores observado no grupo de implantes submetidas a jato de areia e condicionamento ácido e com valores mais elevados obtidos no grupo tratado por condicionamento ácido e anodização. Houve diferenças estatisticamente

significativas entre os lotes de implantes de todas as empresas avaliadas, indicativos de uma variação substancial na topografia do implante de um lote para outro. O autor questionou os baixos valores de rugosidade encontradas nas medidas e as diferenças entre os valores dos lotes e sugeriu que estas empresas devem considerar melhorar os seus tratamentos de superfície para conseguir rugosidade mais uniforme.

O Titânio é um dos biomateriais mais utilizados para a fabricação de implantes dentários assim as propriedades da superfície dos implantes influenciam fortemente a osseointegração. Gardin em 2014 com o intuito de investigar as características de implantes dentários de Ti em termos de mutagenicidade, hemocompatibilidade, biocompatibilidade, osteoindutividade e segurança biológica. O ensaio de Ames foi usada para testar a mutagenicidade dos implantes dentários Ti, e o ensaio de hemólise para avaliar a sua hemocompatibilidade. Foram então semeadas material adiposo humano - derivadas de células estaminais, sobre estes implantes, a fim de avaliar a sua citotoxicidade. A expressão dos genes analisados com PCR em tempo real foi levado a cabo para investigar a osteoindutividade dos biomateriais. Finalmente, a estabilidade genética das células cultivadas em implantes dentários foi determinada por cariotipagem. Os resultados demonstraram que implantes dentários de Ti não são mutagênicos, não causam hemólise e são biocompatíveis. O ensaio MTT revelou que ADSCs, semeadas em implantes dentários de Ti proliferam até 30 dias em cultura. Além disso, ADSCs carregados em implantes dentários de Ti mostram uma expressão substancial de alguns marcadores específicos dos osteoblastos, tais como COL1A1, OPN, ALPL, e RUNX2, bem como a estabilidade cromossômica após 30 dias de cultura em meio sem fatores osteogênicos. O tratamento grit-blasted e gravado por ácido parece favorecer a adesão e proliferação de ADSCs e melhorar a osteoindutividade de superfícies de implantes dentários de Ti.

A Topografia da superfície do implante, é um fator determinante que afeta a diferenciação osteoblástica. Bryington no 2014 para avaliar os eventos precoces osteoindutoras e sinalização célula-célula em células aderentes, implantes de titânio comercialmente puro (2,2 x 5 mm) com nanotopografia (TiO₂ tratados com HF-grit Blasted) foram comparados com topografia micro-escala de TiO₂ grit-Blasted (micron escala, controle) implantes *in vivo*. Seis implantes foram colocados em 10 sujeitos saudáveis sistemicamente e removido por roscagem inversa em 1, 3 e 7 dias. Perfis de células aderentes de expressão de genes, foram interrogados usando matrizes de baixa densidade de RT-PCR. Osteoindução não foi observado no dia 1, em ambas as superfícies. Aos 3 dias, os níveis

elevados de BMP6, osteopontina, e osterix (OS X) foram observadas em RNA de células aderentes nas superfícies, tanto em escala micron e nanotopografica. Ambas as superfícies mantiveram expressão do gene osteoindutor aos 7 dias; no entanto, a maioria dos aumentos modestos de mRNAs, e níveis significativamente mais elevados de ARNm OSX, foram medidos para as células aderidas aos implantes nanotopografia. Implantes com topografia nanoescala, geram uma maior indução de genes ligados a osteogênese e sinalização célula-célula durante as fases iniciais de osseointegração.

A adesão de queratinócitos e de fibroblastos gengivais humanos para avaliar duas superfícies preparadas por oxidação anódica de titânio comercialmente puro (CpTi) foi investigada por Dorkhan em 2014. O efeito de bactérias orais na adesão de queratinócitos foi avaliada pelos autores. As superfícies foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O número de células aderidas e força de ligação, bem como a vitalidade de fibroblastos e queratinócitos foram avaliadas utilizando microscopia confocal a laser após coloração com o Live / Dead BacLight. Para avaliar o efeito sobre a adesão de bactérias e sua vitalidade, os queratinócitos foram co-cultivadas com 4 espécies de estreptococos comensais. Análise em MEV mostrou as duas superfícies anodicamente oxidados a ser nanoestruturado com diferentes graus de densidade de poros. Ao longo de 24 horas, ambos os fibroblastos e queratinócitos aderiram bem nas superfícies nanoestruturados, embora a um grau menor do que para CpTi (intervalo de 42-89% dos níveis de CpTi). A força de adesão de queratinócitos foi maior do que a dos fibroblastos, mas não houve diferenças na força de adesão entre as duas superfícies. O consórcio de estreptococos comensais reduziu marcadamente a adesão de queratinócitos em todas as superfícies, bem como comprometeu a integridade da membrana das células aderidas. Tanto a vitalidade e nível de aderência de células de tecido mole para as superfícies nanoestruturados foi semelhante àquela em CpTi. A co-cultura com estreptococos reduziu o número de queratinócitos em todas as superfícies para aproximadamente o mesmo nível e causou dano celular, sugerindo que as bactérias comensais poderia afectar a adesão de células de tecido mole para as superfícies de intermediários *in vivo*.

Ramaglia em 2015 analisou os efeitos de propriedades de superfície de titânio sobre o comportamento biológico de fibroblastos gengivais humanos. FGHs foram cultivados *in vitro* sobre uma superfície de titânio modificado por um procedimento gravada com dois ácidos e sobre uma superfície usinada para controle. A adesão celular, proliferação, apoptose, produção de certas proteínas da matriz extracelular (ECM), e expressão de granulócitos e macrófagos (receptor do fator estimulante de colônias-GM-CSFR) foram investigados

utilizando em cada experimento um total de 18 amostras para cada uma das superfícies de titânio. A fixação das células em 3 h de cultura foi estatisticamente superior na superfície condicionada. Crescimento de FGH aumentou em ambas as superfícies ao longo de todo o período experimental e ao 14 ° dia de cultura, a proliferação celular foi significativamente mais elevada sobre a superfície tratada do que na de controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na percentagem de eventos de apoptose entre as superfícies. Produção de proteína ECM aumentou progressivamente ao longo do tempo em ambas as superfícies. Uma deposição estatisticamente significativa foi observada no dia 7 e 14 para o colagénio I e apenas no dia 14 para a fibronectina e tenascina, quando comparado com a linha de base. GM-CSFR registou uma expressão positiva em ambas as superfícies, estatisticamente significativa no dia 14 na superfície condicionada em comparação com a usinada. Os dados mostraram que a superfície microtopográfica no titânio modulou resposta *in vitro* de células e expressão fenotípica das FGHs. A superfície condicionada promoveu uma maior proliferação celular e diferenciação, melhorando o comportamento biológico de FGHs.

Zizzari et al em 2015 avaliaram *in vitro* o comportamento e a biocompatibilidade de osteoblastos humanos primários (HOs), cultivados em diferentes superfícies de implante. HOs foram cultivadas em discos de titânio com superfície jateada e gravado ácido (grupo controle) ou jateada, gravada por ácido, seguido por revestimento com íons inorgânicos (grupo de teste). Ambas superfícies promoveram adesão e proliferação de HOs. Após 21 dias, as células nas superfícies teste se mostraram bem espalhadas, achatadas e anexado por extensões celulares, enquanto que as células em discos de controle apareceram principalmente alongadas. Maiores valores de MTT foram registradas para as células da superfície teste em relação ao controle em cada tempo experimental. A liberação de colagénio tipo 1 aumento até 14 dias, diminuindo significativamente no dia 21 em células cultivadas em ambas as superfícies. A secreção de IL-6 e PGE2 mostro um pico em amostras do grupo controle no dia 7, ao passo que os seus níveis não modificaram significativamente em ambos os grupos nos dias 14 e 21. Os resultados indicaram que a superfície do grupo teste resultou em maior biocompatibilidade e apropriado para suportar o crescimento e proliferação de osteoblastos.

Gasik ainda neste ano avaliou diferentes tipos de implantes de titânio que foram testados *in vivo*, utilizando a mesma metodologia analítica. Além de parâmetros de materiais, parâmetros histomorfométricos chave, como área de regeneração, área de adaptação óssea e contato osso-implante foram determinados após 2 e 4 semanas de implantação em modelo animal (coelho). Implantes porosos têm diferenças mais claras do que as não-porosas, com os

melhores valores, obtidos no tratamento hidrotérmico de titânio depositada eletroforéticamente. Estes dados *in vivo* correlaciona bem com a previsão ótima feita por meio de testes *in vitro*.

2.3 Ensaios de mineralização, sobre diferentes superfícies dos implantes

Ecarot-Charrier et al 1983 apresentaram um método para o isolamento de osteoblastos de calvárias de ratos recém-nascidos sem o uso de enzimas digestivas. O procedimento consistiu na capacidade de os osteoblastos migrarem do osso para em pequenos fragmentos de vidro. As células isoladas foram cultivadas durante até 14 dias em meio Dulbecco modificado por Eagle, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 microgramas / ml de ácido ascórbico. Aos 7 dias de cultura foram incubadas durante 24 h com [3H] prolina. Os níveis elevados de síntese de colágeno em relação à proteína total foram encontrados, tais como medidos por digestão com colagenase de proteínas das camadas de células. Análise de proteínas digerida com pepsina das mesmas culturas por SDS-PAGE mostrou que o colagénio do tipo I foi predominantemente produzido com pequenas quantidades de tipo III e V (cadeias alfa 1) colagênicos. Os osteoblastos cultivados na presença de beta-glicerofosfato e foi capaz de iniciar a deposição mineral em cultura. Análise de microscopia eletrônica das culturas revelaram a presença de cristais de apatita em forma de agulha associados com as fibrilas de colágeno e vesículas no espaço extracelular. Fibroblastos da pele de ratos cultivados com as condições idênticas não conseguiram iniciar a mineralização. Estudos histoquímicos revelaram a presença de atividade de fosfatase alcalina, associado com membranas de osteoblastos, e vesículas de matriz sobre ou perto das fibrilas de colágenos. Assim, estes osteoblastos isolados mantiveram sua propriedade única de iniciar mineralização e, portanto, representaram um modelo de valor para o estudo do processo de mineralização *in vitro*.

Bellows et al 1986 para determinar a capacidade dessas populações para formar osso mineralizado, suspensões de uma única célula obtidos a partir de digestões enzimáticas sequenciais de calvária de ratos fetais cresceram em cultura de longo prazo na presença de ácido ascórbico, Na beta-glicerofosfato, e dexametasona. Em culturas de células osteoblásticas cultivadas na presença de ácido ascórbico e beta-glicerofosfato ou somente com ácido ascórbico. Nódulos tridimensionais (cerca de 75 micron de espessura) cobertos por células poligonais que se assemelharam a osteoblastos podiam ser detectadas 3 dias após a

confluência. Os nódulos se tornaram macroscópicos (até 3 mm de diâmetro) após mais 3-4 dias. Apenas na presença de fosfato orgânico mineralizaram. Os nódulos não se desenvolveram sem ácido ascórbico no meio. Dexametasona provocou um aumento significativo no número de nódulos. Histologicamente, os nódulos se assemelham ao tecido ósseo e as células que cobrem os nódulos são altamente coradas para a fosfatase alcalina. Imunomarcagem com anticorpos específicos demonstraram coloração intensa de colágeno tipo I, que foi associada à mineralização, uma coloração mais fraca para colágeno tipo III e osteonectina e não detectável coloração para colágeno tipo II. Os resultados indicam que as células de calvária podem formar nódulos de osso mineralizado, *in vitro*, na presença de ácido ascórbico e de fosfato orgânico.

Rosa et al em 2009 com o intuito de investigar a influência da estrutura porosa de titânio (Ti) sobre o comportamento de células osteogênicas, discos de superfície porosa de titânio, foram fabricados pelo processo metalúrgico do pó com tamanho dos poros aproximadamente entre 50 e 400 microns e uma porosidade de 60%. Células osteogênicas obtidas a partir de osso alveolar humano foram cultivadas até subconfluência e subcultivadas em densidade sobre Ti (controle) e Ti poroso, por períodos de até 17 dias. Culturas cultivadas em Ti poroso, exibiram um aumento da proliferação de células e conteúdo de proteína total, e níveis mais baixos na atividade de fosfatase alcalina (ALP) do que Ti denso. Em geral, a expressão de genes osteoblásticos de marcadores-Runt, relacionado ao fator de transcrição 2, colágeno do tipo I, fosfatase alcalina, proteína morfogenética óssea-7 e de osteocalcina foram mais baixas no dia 7 e no dia 17 e mais elevados em culturas cultivadas em Ti poroso em comparação com Ti denso. Esse achado é consistente com a taxa de crescimento reforçada para essas culturas. A quantidade de matriz mineralizada foi maior no Ti poroso em comparação com o Ti denso. Estes resultados indicaram que o Ti poroso é um substrato adequado para a adesão e proliferação celular, além da produção de uma matriz mineralizada. Por causa do ambiente tridimensional que proporciona, o Ti poroso deve ser considerado um substrato vantajoso para promover interações desejável na superfície implantes-osso.

2.4 Técnica do enxerto ósseo em neoformação: estudos em modelos animais e em seres humanos

A técnica do enxerto ósseo em neoformação foi proposta por Passanezi et al. em 1989 em estudo clínico e histológico realizado em cães e em estudo de caso realizado em seres humanos. Consiste da criação de alvéolo por meio da extração de dentes condenados ou da perfuração do rebordo com broca esférica em baixa rotação e posterior coleta e transferência do material de granulação presente no interior do alvéolo para o tratamento de defeitos periodontais infraósseos 21 a 25 dias depois. No estudo pré-clínico, defeitos de furca foram criados cirurgicamente em molares superiores de 6 cães adultos. Simultaneamente, foram extraídos os incisivos inferiores dos cães, removendo-se os septos interproximais. Depois de 20 dias, os defeitos infra-ósseos nos molares maxilares foram tratados por meio da transferência do material de granulação óssea presente no interior dos alvéolos, até o nível ósseo preexistente, enquanto que os defeitos do grupo controle não receberam tratamento algum, sendo preenchido apenas pelo coágulo. Os animais foram sacrificados em períodos de 3 a 75 dias. Foram tratados ainda dois pacientes, os quais receberam tratamento periodontal regenerativo por meio de enxerto ósseo em neoformação obtido de alvéolos cirurgicamente criados em defeitos infra-ósseos profundos localizados na região de pré-molar inferior e molar inferior. A análise histológica dos espécimes demonstrou que os defeitos tratados com “enxerto ósseo em neoformação” foram preenchidos com tecido ósseo neoformado, novo cemento e novo ligamento periodontal funcionalmente inserido, enquanto que os sítios controle, tratados por meio de raspagem a campo aberto e posicionamento coronal do retalho, mostraram formação de novo cemento em área coronal ao defeito pré-existente, sem formação de novo osso ou novo ligamento periodontal. Os casos clínicos tratados por meio da técnica de “enxerto ósseo em neoformação” resultaram em diminuição da profundidade de sondagem, ganho de inserção clínica e fechamento radiográfico do defeito após 5 anos de observação. Análise histológica demonstrou a formação de novo osso, novo cemento e novo ligamento periodontal funcionalmente inserido e coronal à base do defeito original, sugerindo plasticidade celular.

O enxerto ósseo em neoformação foi utilizado para tratamento de recessões gengivais extensas (>4 mm) por Ferraz em 2009. Neste estudo, 15 pacientes apresentando recessão gengival classe I ou II de Miller com extensão apical ≥ 4 mm foram tratados por meio do enxerto ósseo em neoformação, obtido de alvéolos cirurgicamente criados 21-25 dias antes do

tratamento (grupo teste; n= 35 defeitos) ou por meio de enxerto de tecido conjuntivo subepitelial (grupo controle; n= 30 defeitos). Os pacientes foram clinicamente avaliados no pré-operatório (baseline) e nos períodos de 1, 3, 6 e 9 meses pós-operatórios quanto às medidas de profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, índice de placa, índice de sangramento gengival, comprimento da faixa de gengiva ceratinizada e altura da recessão. Os resultados obtidos demonstraram que as duas técnicas são igualmente efetivas na redução da recessão gengival (teste: $-2,77 \pm 0,16$; controle: $-3,20 \pm 0,24$; $p = 0,14$). Os dois grupos mostraram melhora de todos os parâmetros clínicos investigados após o tratamento. Os sítios tratados com enxerto ósseo em neoformação mostraram maior redução da profundidade de sondagem (teste: $0,85 \pm 0,10$; controle: $0,24 \pm 0,12$; $p < 0,0001$), do sangramento à sondagem (teste: $-0,65 \pm 0,21$; controle: $0,00 \pm 0,13$; $p = 0,01$) e maior ganho de inserção clínica (teste: $-3,74 \pm 0,26$; $-2,95 \pm 0,10$; $p = 0,024$). O grupo controle apresentou maior aumento na faixa de gengiva ceratinizada (teste: $0,48 \pm 0,13$; controle: $1,43 \pm 0,17$; $p < 0,0001$). Esses resultados sugerem que a técnica do enxerto ósseo em neoformação é efetiva para o tratamento de recessões gengivais extensas, permitindo o recobrimento parcial ou completo da recessão, bem como regeneração dos tecidos periodontais.

Em 2012, Sant'ana et al. descreveram série de caso clínico para detalhar a técnica de recobrimento de defeitos de recessão profundos (>4 mm) por meio de enxerto ósseo em neoformação. Os parâmetros periodontais clínicos, incluindo profundidade da recessão, profundidade de sondagem, nível de inserção, sangramento à sondagem, índice de placa e comprimento de gengiva ceratinizada foram avaliados por examinador único imediatamente antes e depois de 1, 3, 6 e 9 meses da cirurgia. Todos os casos mostraram redução da recessão e profundidade de sondagem em associação ao ganho de inserção, embora não houvesse aumento da faixa de gengiva ceratinizada. Esses achados sugeriram que a técnica poderia favorecer a regeneração periodontal e o recobrimento radicular nestas situações clínicas.

2.5 Características do tecido de granulação presente em alvéolos em reparação

O material da granulação óssea foi caracterizado pela primeira vez por Evian et al. em 1982. Amostras de tecido ósseo em neoformação foram removidas de sítios de extração em intervalos de tempo de 4, 6, 8, 10, 12 e 16 semanas. Os resultados obtidos demonstraram que a proliferação de células e tecido conjuntivo dentro dos alvéolos ocorreu no período de 4 a 8

semanas, quando foi observada a formação de novo osso com material osteóide circundado por osteoblastos presente dentro do tecido conjuntivo. De 8 a 12 semanas, o material sofre maturação e forma padrão trabecular, com preservação de material osteóide em menor número. Observa-se maturação das trabéculas ósseas, com pouco material osteóide e osteoblastos no período compreendido entre 12 a 16 semanas, semelhantemente à morfologia do osso trabecular.

Em 1984, Amler considerou que o tecido ósseo medular apresenta maior tendência de formar osso quando transplantado no início de seu período regenerativo mais ativo do que quando amadurecido. Para testar esta hipótese, pequenos segmentos de esponja de polivinil foram implantadas em cavidades cirurgicamente criadas no fêmur de ratos, servindo como matriz para regeneração celular em procedimentos de enxerto. Houve formação de novo osso em 16 de 22 casos (72,7%) quando o material medular em regeneração foi usado para preenchimento do defeito, comparado com formação de osso em 4 de 23 casos (17,4%), quando foi utilizado tecido ósseo maduro ($p= 0.0002$). Não houve formação de novo osso quando se utilizou apenas as esponjas para enxerto (controle).

Cardaropoli et al. em 2003 realizaram estudo experimental para estudar os eventos envolvidos na reparação dos compartimentos marginal, central e apical de alvéolo de extração, a partir da formação do coágulo sanguíneo até a remodelação do novo tecido duro formado. Foram utilizados 9 cães no experimento. Os cães tiveram os 4º pré-molares divididos em uma porção mesial e outra distal. A raiz distal foi removida e o alvéolo com o tecido mole e mineralizado circundante foi chamado de “unidade experimental”. Os animais foram sacrificados nos períodos de 1, 3, 5, 7, 14, 30, 60, 90, 120 e 180 dias após a extração da raiz, quando foram removidas biópsias para análise histológica. De cada espécime, três secções representando a porção central do alvéolo foram selecionadas para exame histológico. As medidas morfométricas foram realizadas para determinar o volume ocupado por diferentes tipos de tecidos nos compartimentos marginal, central e apical do alvéolo de extração nos diferentes intervalos. Durante os 3 primeiros dias de reparação, o coágulo ocupou a maior parte do sítio. Depois de 7 dias, o coágulo foi em parte substituído por matriz provisória. No dia 14, o tecido do alvéolo estava formada por matriz e osso imaturo. No dia 30, osso mineralizado ocupou 88% do volume do alvéolo. Este tecido diminuiu para 15% no dia 180. A porção ocupada por osso medular nos espécimes de 60 dias foi cerca de 75%, porém aumentou para 85% no dia 180. Esses achados sugeriram que a reparação de alvéolo de extração envolveu uma série de eventos incluindo a formação de coágulo e sua substituição

por matriz colágena provisória, osso imaturo, osso lamelar e osso medular. Durante o processo de reparação, uma ponte de tecido duro (osso cortical) foi formada, fechando o alvéolo.

Cardaropoli et al. (2005) investigaram o padrão de reparação de alvéolos de extração e em defeitos cirurgicamente criados, enxertados ou não, no rebordo alveolar com os objetivos de determinar se a ausência de ligamento periodontal pode alterar as características da reparação do alvéolo de extração; examinar se existem diferenças na proporção dos diferentes tecidos envolvidos no processo de reparação de alvéolos de extração e defeitos cirurgicamente criados 3 meses após a cicatrização; estudar a influência de diferentes biomateriais na cura de defeitos cirurgicamente criados. Os sítios de extração foram criados em cinco cães após a hemiseção e remoção das raízes distais de 4 pré-molares inferiores. Um dos alvéolos foi instrumentado para remover todos os remanescentes de ligamento periodontal. Os animais foram sacrificados após 3 meses. Os defeitos foram criados 3 meses após a extração de pré-molares e molares em ambos os lados da mandíbula. Defeitos cilíndricos foram então preparados com 3.5 mm de diâmetro e 8 mm de profundidade. Em cada quadrante, um defeito foi enxertado com Bio-Oss Collagen, outro com esponja de colágeno e outro foi mantido sem enxerto. Os animais foram sacrificados 3 meses depois. Não houve diferenças entre as características morfológicas dos alvéolos com ou sem preservação de ligamento periodontal. Observou-se, apicalmente à ponte óssea neoformada, o predomínio de osso medular, com algumas trabéculas de osso lamelar presente. Os defeitos cirurgicamente criados não enxertados foram selados por ponte de tecido duro. Nas porções central e apical dos defeitos, osso medular ocupou cerca de 61% da área e o osso mineralizado cerca de 39% dos tecidos. A invaginação da superfície da crista óssea foi de 0.8 ± 0.3 mm. Os defeitos tratados com esponja de colágeno foi coberto por ponte de tecido duro, sendo que 38% do tecido dentro do defeito estava constituído de osso medular, enquanto os 62% remanescentes foram constituídos de osso mineralizado. A invaginação da ponte de tecido duro foi de 0.6 ± 0.1 mm. Os defeitos tratados com Bio-Oss Collagen mostraram ocupação de porção substancial do volume tecidual pelo biomaterial. Cerca de 85% da periferia do biomaterial estavam em contato direto com novo osso mineralizado. Osso imaturo e medular ocuparam 47% e 26% do tecido neoformado. A invaginação da porção mais coronal do defeito foi de 0.1 ± 0.1 mm. Esses achados sugeriram que a remoção do ligamento periodontal do alvéolo não altera o padrão de cura dos alvéolos 3 meses após a extração do dente. Os tecidos presentes em alvéolos pós-extração pareceram mais maduros do que aqueles presentes em

defeitos criados cirurgicamente de dimensões semelhantes. Os alvéolos tratados com Bio-Oss Collagen mostraram menor alteração dimensional do que alvéolos tratados com esponja de colágeno ou sem tratamento adicional.

Penteado et al. em 2005, considerando que o tecido em cicatrização nos alvéolos de extração são mais efetivos na indução da formação óssea que o osso maduro, caracterizaram o material coletado de alvéolos em cicatrização 4 semanas após a extração de 6 dentes em seres humanos e encontraram marcação positiva para colágeno tipo I, osteonectina e sialoproteína óssea, com maior taxa de proliferação celular nas porções mais coronais do alvéolo, independente da colocação ou não de barreira de membrana. Os achados imunohistoquímicos e em microscopia eletrônica de transmissão sugeriram que o material apresenta característica osteoblástica por natureza.

Heberer et al. em 2012 avaliaram o potencial osteogênico de células mesenquimais embebidas na matriz provisória de alvéolos de extração com ou sem enxerto de Bio-OssCollagen 6 semanas após a extração. Vinte e cinco pacientes com 47 sítios de extração participaram do estudo. No momento de instalação do implante, biópsias da área da extração foram coletadas e posteriormente analisadas por imunohistoquímica para avaliação do potencial osteogênico das células mesenquimais utilizando anticorpos contra Runx2, osteonectina e osteocalcina. Dos 47 alvéolos examinados, 17 demonstraram ossificação quase completa, permitindo a análise imunohistoquímica de 21 alvéolos não enxertados e 9 enxertados. Não houve evidências de inflamação aguda ou crônica nos espécimes. Não houve diferenças significantes na quantidade média de células positivas para Cbfa1/Runx2 (sítios não enxertados 73.2% vs. sítios enxertados 73.3%), OSN/SPARC (sítios não enxertados- 66.9% vs. sítios enxertados- 61.4%) e OC (sítios não enxertados- 23.4% vs. sítios enxertados- 20.1%) entre os dois grupos. A densidade celular não se correlacionou com a quantidade e células marcadas independente das proteínas usada. Esses achados sugeriram que a matriz provisória apresenta grande proporção de células apresentando maturação de células osteoprogenitoras maduras em osteoblastos.

Recentemente, células da granulação óssea obtidas a partir de alvéolos cirurgicamente criados foram cultivadas e caracterizadas por Valdivia em 2013. Foram coletadas amostras de tecido ósseo presente no alvéolo de cicatrização de dois pacientes adultos saudáveis sistemicamente com indicação de cirurgia periodontal regenerativa pela técnica do enxerto ósseo em neoformação. Imediatamente após a coleta, as amostras foram transportadas ao

laboratório de cultura de células para estabelecimento da cultura primária. As células foram cultivadas em atmosfera úmida, contendo 5% CO₂ a 37°C. A curva de crescimento das células foi determinada por meio de contagem de células viáveis. Após a caracterização da curva de crescimento, foram realizadas a caracterização da amostra por meio de determinação da atividade de fosfatase alcalina e de mineralização. O teste de proliferação celular mostrou que houve aumento significativo ($p < 0.05$; ANOVA para medidas repetidas) do número de células vitais presentes na cultura nos dias 3 (90,8%), 5 (132,50%), 7 (137,50%) e 10 (227,50%) em relação ao controle (dia 0). Foram observadas atividade de fosfatase alcalina e de mineralização *in vitro*. Esses achados sugeriram que as células GO apresentam alta atividade de proliferação e síntese, sendo compatíveis com células de linhagem osteoblástica.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo

O objetivo primário deste estudo é avaliar a resposta de células de linhagens fibroblásticas e osteoblásticas sobre diferentes superfícies de implantes de Ti comercialmente puro.

3.2 Objetivos secundários

Os objetivos secundários desta pesquisa são:

- Determinar a rugosidade superficial obtida com os diferentes tipos de tratamento de superfície realizados nos discos de titânio;
 - Determinar a composição química superficial dos diferentes discos de titânio;
 - Determinar qual o tratamento de superfície resulta em maior adesão de células fibroblásticas e osteoblásticas;
 - Determinar a taxa de proliferação de células fibroblásticas e osteoblásticas sobre discos de titânio de diferentes tratamentos superficiais;
 - Determinar qual o tratamento de superfície resulta em maior formação de grânulos mineralizados pelas células osteoblásticas;
 - Determinar atividade de fosfatase alcalina de células fibroblásticas e osteoblásticas sobre discos de titânio com diferentes tratamentos de superfície.
-
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de discos de titânio

Foram utilizados neste estudo discos de titânio comercialmente puro grau IV com dimensões de 6,0mm de diâmetro X 2,0mm de espessura (Figura 1). Os discos de titânio, fornecidos pela empresa Neodent (Curitiba, PR, Brasil) foram divididos em 4 grupos de acordo com o tratamento de superfície:

- L: discos usinados (controle);
- JATO: discos usinados seguido de jateamento abrasivo;
- NP: discos usinados, jateados e tratados por subtração ácida (superfície NeoPoros);
- ACQ: discos com tratamento superficial para melhora da hidrofília (superfície Acqua).

Figura 1- Ilustração do disco de titânio comercialmente puro grau IV com diferentes tratamentos de superfície e dimensões de 2mm de espessura x 6 mm de diâmetro utilizados no estudo

A Figura 2 descreve a distribuição dos discos de titânio em cada ensaio realizado no estudo, de acordo com os grupos de tratamento e células cultivadas.

	Grupo 1 N=76		Grupo 2 N=76		Grupo 3 N=76		Grupo 4 N=76	
<i>Caracterização de superfície</i>
<i>Teste de proliferação</i>	Células FGH		Células FGH		Células FGH		Células FGH	
	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs

	Células GO		Células GO		Células GO		Células GO	
	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs

<i>Ensaio de fosfatase alcalina (14 dias)</i>	Meio convencional		Meio convencional		Meio convencional		Meio convencional	
	FGH	GO	FGH	GO	FGH	GO	FGH	GO

	Meio osteogênico		Meio osteogênico		Meio osteogênico		Meio osteogênico	
		GO		GO		GO		GO

<i>Ensaio de Mineralização</i>	Meio convencional		Meio convencional		Meio convencional		Meio convencional	
	Células GO		Células GO		Células GO		Células GO	
	14 dias	28 dias	14 dias	28 dias	14 dias	28 dias	14 dias	28 dias

	Meio osteogênico		Meio osteogênico		Meio osteogênico		Meio osteogênico	
	Células GO		Células GO		Células GO		Células GO	
	14 dias	28 dias	14 dias	28 dias	14 dias	28 dias	14 dias	28 dias

Figura 2- Desenho experimental

4.2 Caracterização da microtopografia de superfície

A microtopografia de superfície dos diferentes tipos de disco de titânio foi avaliada por meio de MEV, em fotomicrografias obtidas em aumentos de 500x. Foi utilizado, para tanto, 1 disco de titânio de cada grupo experimental. As imagens obtidas foram analisadas no software de análise de imagens ImageJ (disponível para *download* em: <http://imagej.nih.gov/ij/>), por meio de um plugin (SurCharJ). Este plugin mede os valores de rugosidade de toda a superfície de acordo com o padrão ISO 4287/2000: Ra (desvio médio aritmético), Rq (desvio da raiz quadrada média), Rku (achatamento do perfil avaliado), Rsk (assimetria), Rv (vale mais baixo), Rp (pico mais alto) e Rt (altura total do perfil).

4.3 Análise EDS (*“Energy Dispersive X-ray Detector”* ou *Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X*)

A composição química dos discos de titânio de superfícies L, JATO, NP e ACQ foi analisada por espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS). O ensaio foi realizado no Laboratório de Tecnologia da Usinagem da Faculdade de Engenharia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Bauru, sendo utilizado para isso 1 disco de titânio de cada grupo experimental. O princípio do ensaio se baseia na incidência de feixe de elétrons sobre o mineral, provocando excitação dos elétrons mais externos dos átomos e dos íons constituintes. Ao retornarem a sua posição inicial, liberam a energia adquirida em comprimento de onda no espectro de raios-X. Um detector instalado no microscópio eletrônico de varredura mede a energia associada desse elétron, permitindo determinar a composição química dos espécimes.

4.4 Cultura de células de linhagem osteoblástica (células GO-1)

Foram convidados a contribuir com este estudo dois pacientes sistemicamente saudáveis, não fumantes, sem uso regular de medicamentos, em atendimento nas clínicas de Periodontia e Clínica Integrada Reabilitadora da FOB-USP, com indicação de tratamento de defeitos periodontais infra-ósseos por meio da técnica do enxerto ósseo de granulação (Passanezi et al. 1989).

Criação do alvéolo cirúrgico

O alvéolo cirúrgico foi criado pela perfuração do rebordo desdentado existente com broca diamantada esférica, conforme descrito por Passanezi et al. (1989). Brevemente, após antisepsia e anestesia adequada da área doadora, será descolado retalho total sobre o rebordo ósseo desdentado, expondo-se a crista óssea do rebordo. Com auxílio de broca cilíndrica em baixa rotação, sob irrigação constante com soro fisiológico, foi criado alvéolo cirúrgico com dimensões aproximadas de 10 mm de profundidade x 3,5 mm de diâmetro, respeitando-se as estruturas anatômicas nobres, como seio maxilar e nervo alveolar inferior. O retalho foi suturado com fio de seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil). Como cuidados pós-operatórios, foram prescritos antibiótico (amoxicilina 500 mg, t.i.d, 7 dias) e anti-inflamatórios não esteroidais (nimesulide 100 mg, b.i.d., 3 dias). Os pacientes foram instruídos a não realizar bochechos vigorosos nas primeiras 48 horas e tiveram as suturas removidas após 7 dias.

A área foi reaberta após 21 dias para realização do tratamento periodontal previsto. Neste momento, após a transferência do material presente no interior do alvéolo para o defeito a ser tratado, o remanescente tecidual presente no alvéolo em cicatrização foi coletado com auxílio de cureta de Lucas e imediatamente colocado em frasco contendo meio de transporte constituído por DMEM contendo 20% de soro fetal bovino (SFB), 200 U/mL de penicilina G potássica, 200 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 20 µg/mL de anfotericina B em pH 7.4 para transporte ao laboratório de cultura de células do Centro Integrado de Pesquisa I da FOB-USP, visando o estabelecimento da cultura primária.

As amostras foram removidas do frasco contendo o meio de transporte e colocadas em placas de Petri contendo solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA) com 2% de solução antibiótica-antimicótica, para lavagem e dissecação fina. Em seguida, os fragmentos teciduais foram colocados em tubo Falcon contendo 10ml de PBSA e centrifugados durante 3 minutos. O PBSA foi aspirado e o precipitado de células resultante foi suspenso em 1ml de DMEM suplementado com SFB a 20% e solução antibiótica e antimicótica a 2%, sendo então transferidas para frascos de cultura de células de 25cm² e mantidos em estufa de 5% de CO₂, à temperatura de 37°C (Figura 3). Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos de manutenção e esterilidade de materiais e soluções utilizadas (Freshney, 2010). O crescimento celular foi monitorado diariamente em microscópio de fase invertido. Assim que surgiram as primeiras

células, 1 ml de meio de cultura foi condicionado a cada 2 dias até atingir 5ml. Depois disso, o meio será trocado até que o crescimento se apresente como monocamada subconflente (70%-80% da área cultivável recoberta por células), quando as células foram destacadas por métodos enzimáticos (solução de tripsina-Cro 25%, EDTA 1mM em PBSA) e cultivadas em frascos progressivamente maiores até atingir número suficiente para a realização dos experimentos.

Figura 3: Aspecto das células e GO em cultura, observado em microscópio de fase.

4.5 Cultura de fibroblastos gengivais humanos (células FGH-1)

Contribuíram com este estudo dois pacientes sistemicamente saudáveis, não fumantes, indicados para tratamento periodontal por meio de gengivectomia interna (n= 1) e enxerto gengival livre (n=1). O tecido gengival removido nos procedimentos cirúrgicos de gengivectomia interna para eliminação de bolsas e no enxerto gengival livre foram imediatamente armazenados em tubos Falcon contendo o meio de transporte anteriormente descrito e levados ao laboratório de cultura de células do Centro Integrado de Pesquisa I para estabelecimento da cultura primária. Para isso, os fragmentos teciduais foram cuidadosamente dissecados em placa de Petri contendo solução tampão fosfato salina (PBS) + 2% de solução antibiótica-antimicótica. A separação das células foi feita por processo mecânico-enzimático, onde os fragmentos teciduais permaneceram imersos em tripsina a 37°C por 5 minutos e depois centrifugados. O processo foi repetido uma vez e o precipitado celular resultante foi suspenso em meio de cultura DMEM (DMEM, Cultilab, Campinas, Brasil) suplementado

com 20% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e 2% de solução antibiótica antimicótica (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) em ambiente com atmosfera úmida, 5% de dióxido de carbono (CO₂), a 37°C (Figura 4).

Figura 4: Aspecto das células FGH em cultura, observado em microscópio de fase.

4.6 Adesão e proliferação das células de linhagem fibroblástica (células FGH-1) e osteoblástica (células GO-1) sobre os discos de titânio com diferentes tratamentos superficiais

Para determinar a influência dos diferentes tratamentos de superfície sobre a adesão de células de linhagens fibroblásticas gengivais e osteoblásticas, foram cultivadas células GO-1 e FGH-1 sobre os discos de titânio dos diferentes grupos (n= 5/grupo/período) em DMEM suplementado com 10% FBS e solução antibiótica e antimicótica, em placas de cultura de 24 poços (Figura 5). Os discos foram mantidos em estufa para cultura de células de atmosfera úmida, contendo 5% CO₂ a 37°C. Sobre cada disco, foram colocadas 5×10^4 células em 50µl de meio de cultura. Após 4 horas, foi acrescido meio de cultivo suficiente (200µl) para cobrir por completo os discos contendo as células cultivadas.

Figura 5- Esquema ilustrativo do ensaio de proliferação das células FGH-1 e GO-1 sobre discos de titânio nos períodos de 24 e 48 horas para cada grupo.

Os discos de titânio contendo as células aderidas foram avaliados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) após 24 (adesão) e 48 horas (proliferação) a partir do cultivo inicial. Para tanto, as amostras foram fixadas com solução de Karnovsky (glutaraldeído 6% e paraformaldeído 4% em tampão cacodilato 0.2 M) durante duas horas. Depois de duas lavagens em tampão cacodilato 0.1 M por 15 minutos, os espécimes foram pós-fixados com tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato a 4°C por duas horas e desidratados com soluções crescentes de etanol (30% a 70%). Após aumento gradativo do gradiente de concentração, os espécimes foram embebidos em hexametildisilazano (HMDS) a 100% em temperatura ambiente por 24 horas e secos ao ar. Após o revestimento com ouro, os espécimes foram visualizados em MEV. De cada espécime, foram obtidas duas fotomicrografias em aumentos de 500x, sendo uma da área central e outra da área periférica. As imagens foram codificadas para análise do percentual do disco recoberto por células.

Para tanto, após calibração do tamanho das imagens, uma grade de área conhecida foi sobreposta sobre as imagens de MEV (Figura 6), utilizando o plugin analyze-Grid do software ImageJ. Foi determinando uma área *per point* de $20000\mu\text{m}^2$ para cada quadrante, permitindo a determinação das áreas do disco sem a presença de células em cada quadrante do quadrado central previamente estabelecido.

Figura 6- Ilustração da calibração das imagem do ensaio de proliferação das células FGH-1 e GO-1 sobre discos de titânio nos períodos de 24 e 48 horas para cada grupo.

Desta forma, a área percentual do disco recoberta por células foi determinada pela aplicação da fórmula:

$$\%AR = \frac{(ATD - AD)}{ATD} \times 100$$

onde AR= área do disco recoberta por células;

ATD= área total do disco; AD= área visível do disco sem células

As superfícies tratadas foram também classificadas em escores, com base na área não recoberta por células (Tabela 2):

Tabela 2- Índice de adesão celular

Escore	Características
0	Ausência de células
1	Menos de 50% do disco recoberto por células
2	De 50% a 74,99% do disco recoberto por células
3	De 75 a 100% do disco recoberto por células
4	100% do disco recoberto por células e presença de 2 ^a camada celular

4.7 Ensaio de atividade de fosfatase alcalina

Para avaliação da atividade de fosfatase alcalina, as células FGH-1 e GO-1 foram plaqueadas sobre discos de titânio dos diferentes grupos posicionados em placas de 24 poços na densidade inicial de 7×10^3 células em meio não osteogênico. Após a adesão, as amostras foram divididas em dois subgrupos: com meio convencional, não osteogênico e com meio osteogênico (Células GO-1), constituído de DMEM + SFB 10% + solução antibiótica-antimicótica + ácido ascórbico (50µg/ml) + β-glicerofosfato (10mM). Os ensaios foram realizados em triplicatas em todos os períodos de investigação. Após 14 dias, a atividade de fosfatase alcalina foi medida. Para isso, os poços foram lavados duas vezes com solução tampão salina e lisados com solução de Triton 100X (Figura 7). A atividade da FA foi observada nas células lisadas usando 25 µl da amostra em placa de 96 poços adicionado com 200 µL de fosfato p-nitrofenol (pNPP) e determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 405nm. A medida da proteína total foi realizada de acordo com o método de Bradford. A absorbância foi medida conforme instruções do fabricante. A atividade de fosfatase alcalina (unidades/ml) foi normalizada de acordo com as medidas de proteína para cada amostra.

Figura 7: Ensaio de atividade alcalina . Em (A) Distribuição das amostras de células GO em DMEM + 10% FBS + 50 $\mu\text{g/mL}$ + β -glicerofosfato 10 mM na placa de 24 poços; (B) Remoção do meio de cultivo e lavagem com PBS; (C) Adição da solução tampão de lise celular; (D) Lise celular com ajuda de pinça clínica e ponta de pipeta; (E) Contagem de proteínas (Bradford); (F) Placa de 96 poços contendo as amostras para análise de atividade de fosfatase alcalina por meio de absorbância em espectrofotometro.

4.8 Ensaio de mineralização

Para este ensaio, 5×10^4 células foram plaqueadas sobre os discos de titânio posicionados em placas de 24 poços contendo DMEM suplementado com 10% SFB e solução antibiótica-antimicótica. Após a adesão inicial, as amostras foram divididas em dois grupos, de acordo com o meio de cultivo: osteogênico e não osteogênico, sendo utilizados, para cada período de investigação, três amostras/grupo. O ensaio de mineralização foi realizado nos períodos de 14 e 28 dias após o cultivo inicial. Para isso, após aspiração do meio, os poços foram lavados com PBS a 37°C e fixados com solução de formalina a 4% e lavados novamente com PBS. Em seguida, os discos de titânio foram corados com vermelho de alizarina para evidenciação dos nódulos de mineralização ricos em cálcio (Figura 8). Os discos foram fotografados mediante estéreo microscópio e as imagens obtidas foram processadas em programa de análise de imagens (Image J, NIH, EUA) para determinação da área (percentual) apresentando formação de nódulos mineralizados.

Figura 8: Ensaio de mineralização. (A) Ilustração da tensão superficial nos discos de titânio com superfície Lisa, Jateada, Neoporos e Acqua (de izquierda a derecha); (B) Plaqueamento das células GO em placa de 24 poços, após a aderência, o meio foi trocado a cada 3 dias e os grupos de meio osteogênico foram suplementados com ácido ascórbico e β -glicerofosfato para indução osteogênica; (C) Retiro do meio sobrenadante e lavagem com PBS nos períodos de 14 e 28 dias após o cultivo; (D) Fixação das amostras com solução de formaldeído 4% durante 10 minutos; (E) Incubação com solução de alizarina durante 10 minutos; (F) Remoção do corante; (E) lavagem com água deionizada pura.

4.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente no software GraphPad Prism para Windows 7, adotando-se em todos os testes nível de significância de 5% ($\alpha = 0.05$). As características de rugosidade de superfície foram comparadas entre os grupos por meio do teste ANOVA a dois critérios pós-teste Tukey. Para o ensaio de adesão e proliferação celular, a comparação entre o percentual de área recoberta e os escores de proliferação sobre os discos dos diferentes grupos foram comparados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn, nos diferentes períodos de avaliação.

Relativamente ao ensaio de mineralização, a análise inter-grupos foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn, enquanto que a análise intra-grupos foi realizada por meio do teste não paramétrico de Wilcoxon.

Para obtenção de amostra suficiente à realização do ensaio de Fosfatase Alcalina, fez-se necessária a utilização de um 'pool' celular, inviabilizando, entretanto, a análise estatística.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da microtopografia de superfície

As características da microtopografia de superfície dos espécimes investigados foi realizada por meio de captura de imagens em MEV e análise de superfície pelo software ImageJ (NIH, USA). Os dados de rugosidade superficial para os espécimes dos diferentes grupos estão descritos na Tabela 3. Não houve diferenças entre os grupos para os parâmetros de rugosidade encontrados nas amostras, com exceção do parâmetro Rsk, onde diferenças significantes foram observadas do grupo L em relação aos grupos JATO, NP e ACQ ($p < 0.05$; ANOVA a dois critérios *post hoc* Tukey).

Tabela 3- Valores de rugosidade de superfície analisados no plugin SurfCharJ (ImageJ, NIH, EUA) [Comprimento da amostra: 100 μ m, nivelamento de superfície]

	L	JATO	NP	ACQ
Rq	0,1289	0,1482	0,1956	0,1616
Ra	0,0983	0,1104	0,1574	0,1252
Rsk	1,9698*	1,5975	0,6909	1,3361
Rkv	13,4801	3,5427	0,1222	2,4683
Rv	-0,2893	-0,2174	-0,4170	-0,2591
Rp	1,9496	0,8084	0,6484	1,1277
Rt	2,2388	1,0258	1,0653	1,3867
Rc	-0,0046	0,0012	0,0009	-0,0030

*diferenças significantes entre o grupo L e os grupos JATO, NP, ACQ ($p = 0.0350$; ANOVA a dois critérios)

Na Figura 9, observa-se as características de plotagem tridimensional das fotomicrografias de MEV no software ImageJ (Plugin Interactive 3D Surface Plot).

Figura 9- Plotagem tridimensional das superfícies L (A), JATO (B), NP (C) e ACQ (D) obtidas por meio do *plugin* Interactive 3D Surface Plot (ImageJ, NIH, USA) onde pode-se observar as características de rugosidade superficial das amostras.

Nas Figuras 10 a 13, observam-se as imagens em MEV e as características de perfil de superfície e plotagem de superfície, respectivamente, das superfícies L, JATO, NP e ACQ.

Figura 10- (A) Imagem em MEV (aumento de 500X) de disco de superfície L; (B) imagem da superfície L após análise das características de superfície pelo programa ImageJ; (C) plotagem bidimensional de superfície de disco L (400 x 400 pixels); (D) Perfil de superfície de disco de superfície L

Figura 11- (A) Imagem em MEV (aumento de 500X) de disco de superfície JATO; (B) imagem da superfície JATO após análise das características de superfície pelo programa ImageJ; (C) plotagem bidimensional de superfície de disco JATO (400 x 400 pixels); (D) Perfil de superfície de disco de superfície JATO

Figura 12- (A) Imagem em MEV (aumento de 500X) de disco de superfície NP; (B) imagem da superfície NP após análise das características de superfície pelo programa ImageJ; (C) plotagem bidimensional de superfície de disco NP (400 x 400 pixels); (D) Perfil de superfície de disco de superfície NP

Figura 13- (A) Imagem em MEV (aumento de 500X) de disco de superfície ACQ; (B) imagem da superfície ACQ após análise das características de superfície pelo programa ImageJ; (C) plotagem bidimensional de superfície de disco ACQ (400 x 400 pixels); (D) Perfil de superfície de disco de superfície ACQ

5.2 EDS

A composição química dos discos de titânio L, JATO, NP e ACQ foram analisados por meio de espectroscopia de difração de raios-X (EDS) e estão descritos na Tabela 4. Os implantes de superfície L (Figura 9A) apresentaram apenas Ti em seu espectro de massa (Figura 14), assim como os implantes de superfície NP (Figura 15). A superfície JATO apresentou em sua composição química, além do Titânio, as substâncias Oxigênio e Alumínio (Figura 16), enquanto na superfície ACQ foram observados os metais Titânio, Sódio e Potássio (Figura 17).

Tabela 4- Composição química dos discos de titânio com diferentes tratamentos de superfície (análise em EDS)

Grupo	Metais	Peso (%)	Peso atômico (%)
L	Ti	100	100
JATO	O	27,09	49,45
	Al	10,78	11,78
	Ti	62,13	32,26
NP	Ti	100	100
ACQ	Na	15,84	26,42
	Cl	22,17	23,97
	Ti	61,99	49,61

Figura 14- Caracterização dos discos de superfície L. (A) Imagem em MEV (aumento de 500x); (B) Mapeamento da superfície; (C) espectro de EDS para a área analisada. Note os picos do elemento Ti presentes.

Figura 15- Caracterização dos discos de superfície NP. (A) Imagem em MEV (aumento de 500x); (B) Mapeamento da superfície; (C) espectro de EDS para a área analisada. Note os picos do elemento Ti presentes.

Figura 16- Caracterização dos discos de superfície JATO. (A) Imagem em MEV (aumento de 500x); (B) Mapeamento da superfície (O); (C) Mapeamento da superfície (Al); (D) Mapeamento da superfície (Ti); (E) mistura dos canais mapeados (O, Al, Ti); (F) espectro de EDS para a área analisada, contendo os picos dos elementos Ti, O e Al.

Figura 17- Caracterização dos discos de superfície ACQ. (A) Imagem em MEV (aumento de 500x); (B) Mapeamento da superfície (Na); (C) Mapeamento da superfície (Cl); (D) Mapeamento da superfície (Ti); (E) mistura dos canais mapeados (Na, Cl, Ti); (F) espectro de EDS para a área analisada, contendo os picos dos elementos Ti, Na e Cl

5.3 Ensaio de adesão e proliferação celular

5.3.1 Percentual de área do disco recoberta por células

No período de 24 horas após o cultivo celular, houve maior proliferação de células FGH sobre as superfícies L ($89,43\% \pm 9,13$; Figura 18B) e JATO (100%; Figura 19B), enquanto que as superfícies NP ($69,77\% \pm 13,97\%$; Figura 20B) e ACQ ($69,67\% \pm 12,16\%$; Figura 21B) apresentaram menor percentual de área do disco recoberto por células FGH. Relativamente às células GO, neste período, observou-se que 100% das superfícies JATO (Figura 19C) e ACQ estavam recobertas por células GO (Figura 21C), enquanto que as superfícies L (Figura 18C) e NP (Figura 20C) apresentaram, respectivamente, $57,11\% \pm 17,72\%$ e $63,87\% \pm 7,23\%$ da superfície recobertas por células GO no período de 24 horas.

Figura 18 – Teste de adesão e proliferação celular sobre discos de superfície L. Em (A), fotomicrografia de MEV em aumento de 500x de disco do grupo L. Em (B), células FGH cultivadas por 24 horas; em (C), células GO cultivadas por 24 horas; em (D) células FGH cultivadas por 48 horas; (E) células GO cultivadas por 48 horas.

Figura 19 – Teste de adesão e proliferação celular sobre discos de superfície JATO. Em (A), fotomicrografia de MEV em aumento de 500x de disco do grupo JATO. Em (B), células FGH cultivadas por 24 horas; em (C), células GO cultivadas por 24 horas; em (D) células FGH cultivadas por 48 horas; (E) células GO cultivadas por 48 horas.

Figura 20 – Teste de adesão e proliferação celular sobre discos de superfície NP. Em (A), fotomicrografia de MEV em aumento de 500x de disco do grupo NP. Em (B), células FGH cultivadas por 24 horas; em (C), células GO cultivadas por 24 horas; em (D) células FGH cultivadas por 48 horas; (E) células GO cultivadas por 48 horas.

Figura 21 – Teste de adesão e proliferação celular sobre discos de superfície ACQ. Em (A), fotomicrografia de MEV em aumento de 500x de disco do grupo ACQ. Em (B), células FGH cultivadas por 24 horas; em (C), células GO cultivadas por 24 horas; em (D) células FGH cultivadas por 48 horas; (E) células GO cultivadas por 48 horas

Nesse período, a superfície lisa (L) apresentou maior percentual de área recoberta por células FGH ($89,43\% \pm 9,13\%$) do que por células GO ($57,11\% \pm 17,72\%$), porém sem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p > 0.05$; Kruskal-Wallis). A superfície NP ($69,77\% \pm 13,97\%$; $p < 0.05$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn) apresentou percentual de área recoberta por células FGH significativamente menor do que as superfícies JATO (Figura 22). Foram observadas diferenças significantes, para as células FGH, entre as superfícies JATO vs. NP e ACQ ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn).

Relativamente às células GO, observou-se percentual médio significativamente menor ($p < 0.001$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn) de células aderidas sobre discos de superfície L ($57,11\% \pm 17,72\%$) do que nas superfícies JATO (100%) e ACQ (100%), porém sem diferenças significantes em relação às superfícies NP ($63,87\% \pm 7,23\%$; $p > 0.05$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn). Similarmente, houve diferenças significantes entre as superfícies NP ($p < 0.005$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn) e as superfícies JATO e ACQ após 24 horas (Figura 22).

Figura 22 - Percentual de área do disco recoberto por células (média $\pm$ desvio-padrão) no período de 24 horas, de acordo com os grupos. Símbolos iguais representam diferenças significantes entre os grupos. * $p < 0.01$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; ** $p < 0.0001$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; + $p < 0.005$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; *Diferenças significantes entre os grupos ACQ-FGH e ACQ-GO (Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn)

Após 48 horas do cultivo inicial (Figura 23), observou-se aumento significativo apenas das células GO sobre as superfícies L ($p = 0.03$; Wilcoxon). As superfícies JATO e ACQ apresentaram 100% da área recoberta por células FGH e GO também no período de 48 horas. Diferenças significantes foram observadas entre o percentual de área recoberta por células FGH nas superfícies JATO comparativamente às superfícies NP e ACQ ($p < 0.01$; Kruskal-Wallis) e, para as células GO, entre as superfícies NP comparativamente às superfícies JATO e ACQ ($p < 0.005$; Kruskal-Wallis). Houve maior percentual de área recoberta pelas células GO do que pelas células FGH ($p < 0.005$; Kruskal-Wallis).

Figura 23 - Percentual de área do disco recoberto por células (média $\pm$ desvio-padrão) no período de 48 horas, de acordo com os grupos. Símbolos iguais representam diferenças significantes entre os grupos. * $p < 0.01$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; ** $p < 0.0005$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; + $p < 0.0001$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; Diferenças significantes entre os grupos ACQ-FGH e ACQ-GO (Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn)

5.3.2 Análise dos parâmetros de proliferação celular sobre os discos de titânio (Escore de proliferação celular)

No período de 24 horas (Figura 24), relativamente às células FGH, houve predomínio de escore 4 (100%) nas superfícies JATO, com diferenças significantes em relação às superfícies NP (mediana - 2,5; $p < 0.05$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn) e ACQ (mediana - 2,0; $p < 0.05$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn), porém sem diferenças significantes em relação à superfície L (mediana - 3; $p > 0.05$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn). Relativamente às células

GO neste período, diferenças significantes foram observadas entre os grupos L (mediana 2,0) e JATO (mediana 4,0; $p < 0.0001$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn) e ACQ (mediana 4,0; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn) e entre as superfícies NP (mediana 2) relativamente às superfícies JATO ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn) e ACQ ($p < 0.0001$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn). A análise comparativa entre células FGH e GO para a mesma superfície mostrou diferenças significantes no grupo (superfície) ACQ ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn).

Figura 24 - Escores de proliferação celular (média ± desvio-padrão) no período de 24 horas, de acordo com os grupos. Símbolos iguais representam diferenças significantes entre os grupos. * $p < 0.05$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; ** $p < 0.0001$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; *** $p < 0.005$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; **** $p < 0.0001$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; ♦ Diferenças significantes entre os grupos ACQ-FGH e ACQ-GO ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn)

No período de 48 horas (Figura 25), para as células FGH, foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.01$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn;) para as superfícies JATO (mediana 4,0) relativamente às superfícies NP (mediana 3,0) e ACQ (mediana 3,0). Para as células GO, foram observadas diferenças significantes entre as superfícies L (mediana 2,5) e as superfícies JATO (mediana 4,0; $p < 0.001$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn;) e ACQ (mediana 4,0; $p < 0.001$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn) e entre as superfícies NP (mediana 2,0) comparativamente às superfícies JATO ($p < 0.0001$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn) e

ACQ ($p < 0.0001$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn). A comparação entre células FGH e GO mostrou diferenças significantes apenas nas superfícies ACQ ($p < 0.01$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn).

Figura 25 - Escores de proliferação celular (média $\pm$ desvio-padrão) no período de 48 horas, de acordo com os grupos. Símbolos iguais representam diferenças significantes entre os grupos. * $p < 0.01$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; ** $p < 0.0005$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; *** $p < 0.001$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn; *Diferenças significantes entre os grupos ACQ-FGH e ACQ-GO ($p < 0.01$; Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn)

5.4 Ensaio de mineralização

Houve formação de nódulos mineralizados em todas as superfícies nos diferentes períodos de avaliação (Figura 26 a 29). A análise comparativa entre os grupos por meio do teste Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn mostrou diferenças estatisticamente significantes para as células GO cultivadas em DMEM sobre as superfícies L ($31,45\% \pm 1,51\%$) e ACQ ($54,94\% \pm 4,80\%$), conforme demonstrado na Figura 30. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos no período de 28 dias ($p = 0.11$). A análise comparativa intra-grupos realizada por meio do teste pareado não paramétrico de Wilcoxon não demonstrou diferenças significantes no percentual de mineralização observado aos 14 e 28 dias em nenhuma das superfícies de tratamento, independentemente do meio de cultivo utilizado.

Figura 26 – (A) Disco de superfície L cultivado com células GO em meio DMEM por 14 dias.; (B) Disco de superfície L cultivado com células GO em meio OST (osteogênico). As imagens quadradas representam $\frac{1}{4}$ da superfície do disco analisado.

Figura 27 – (A) Disco de superfície JATO cultivado com células GO em meio DMEM por 14 dias.; (B) Disco de superfície JATO cultivado com células GO em meio OST (osteogênico). As imagens quadradas representam $\frac{1}{4}$ da superfície do disco analisado.

Figura 28 – (A) Disco de superfície NP cultivado com células GO em meio DMEM por 14 dias.; (B) Disco de superfície NP cultivado com células GO em meio OST (osteogênico). As imagens quadradas representam $\frac{1}{4}$ da superfície do disco analisado.

Figura 29 – (A) Disco de superfície ACQ cultivado com células GO em meio DMEM por 14 dias.; (B) Disco de superfície ACQ cultivado com células GO em meio OST (osteogênico). As imagens quadradas representam $\frac{1}{4}$ da superfície do disco analisado.

Figura 30- Percentual (média $\pm$ desvio-padrão) de área mineralizada produzida pelas células GO nos diferentes grupos (L, JATO, NP e ACQ), meios de cultivo (DMEM- convencional ou OST- osteogênico) e períodos de tempo (14 dias ou 28 dias). * $p=0.0044$; Kruskal-Wallis *post-hoc* Dunn

5.5 Ensaio de fosfatase alcalina

No período avaliado (14 dias), as células FGH-1 e GO-1 mostraram atividade de fosfatase alcalina em meio osteogênico e convencional. Para obtenção de amostra suficiente à realização deste experimento, fez-se necessária a utilização de um 'pool' celular, inviabilizando, entretanto, a análise estatística. De maneira observacional, foi possível determinar que os maiores valores obtidos foram correspondentes às células GO-1 em meio convencional (DMEM) sobre os discos de titânio de superfície lisa, seguidos da superfície Acqua, conforme é possível visualizar na Figura 31, que descreve a atividade de fosfatase alcalina das células FGH-1 e GO-1 cultivadas em meio não osteogênico constituído por DMEM + 10% SFB e em meio osteogênico (OSTEO) DMEM + 10% SFB + 50 $\mu\text{g/ml}$ ácido ascórbico + 10mM β -glicerofosfato no período de 14 dias. Todas as superfícies demonstraram maior atividade quando cultivadas em meio convencional, exceto a superfície Neoporos (N Osteo GO), que determinou maior atividade quando meio osteogênico.

Figura 31: Atividade de fosfatase alcalina das células de FGH-1 e GO-1 cultivadas em meio não osteogênico constituído por DMEM + 10% SFB e em meio osteogênico (OSTEO) DMEM + 10% SFB + 50 µg/ml ácido ascórbico + 10mM β-glicerofosfato no período de 14 dias.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este estudo investigou as características de superfície de discos de titânio submetidos a diferentes tipos de tratamento e sua influência na adesão, proliferação e diferenciação de fibroblastos gengivais e células osteoblásticas humanas. Pode-se observar, de forma geral, que as superfícies moderadamente rugosas (jateadas e Acqua) apresentaram maior percentual de células osteoblásticas do que superfícies lisas ou mais rugosas. Além disso, as superfícies Acqua apresentaram maior compatibilidade às células osteoblásticas do que fibroblásticas, o que poderia levar a maior atividade osteogênica *in vivo* e favorecer os procedimentos reconstrutivos peri-implantares. Esses resultados são semelhantes àqueles descritos em outros estudos publicados na literatura empregando diferentes tipos de implantes (Le Guehennec et al. 2008; Rosa et al. 2009; Lavenus et al. 2011; Mendonça et al. 2009, 2010, 2011; Bryington et al. 2014).

Os discos de titânio utilizados neste estudo foram fornecidos pela Neodent (Curitiba, PR, Brasil) utilizando titânio comercialmente puro (grau IV) e quatro diferentes formas de tratamento da superfície: usinados (L), jateados (JATO), jateados e tratados por soluções ácidas (NP) e jateados, tratados por ácido e modificados do ponto de vista físico-químico para aumento da molhabilidade (ACQ). Os discos de superfície ACQ (Acqua) apresentam tratamento de superfície que torna a superfície do implante biologicamente ativa, estimulando a migração e diferenciação celular, sem alterar a rugosidade superficial e, ao mesmo tempo, levando à formação de camada de óxidos superficiais eletropositivas, permitindo a interação superfície do implante-célula de forma direta, sem necessitar da ligação de outros fatores, como o cálcio (Rupp et al. 2004; Gittens et al. 2011).

Outros estudos (Soares et al. 2013) investigaram a influência de diferentes tratamento de superfície de implantes de titânio, incluindo as superfícies Neoporos e Acqua, ambas da empresa Neodent, também investigadas neste estudo, na diferenciação e maturação celular. As amostras foram cultivadas com linhagens imortalizadas de osteoblastos, utilizando-se como controle o prato de cultura. A superfície Acqua apresentou menor viabilidade celular e número de células aderidas do que as superfícies Neoporos ou controle (prato de cultura), conforme investigado por meio de atividade mitocondrial (MTT). Por outro lado, essas superfícies apresentaram maior atividade de fosfatase alcalina e proteína total do que as demais, indicando que a superfície Acqua resulta em maior diferenciação celular e que a

superfície Neoporos resulta em maior taxa de proliferação. No entanto, no presente estudo, observamos que a taxa de mineralização foi maior para a superfície Acqua, tanto em meio convencional quanto em meio osteogênico, indicando maior atividade de síntese e diferenciação celular. Outro estudo (Mendonça et al. 2013) observou maior atividade de fosfatase alcalina, especialmente aos 14 dias, e níveis mais altos de proliferação de células nas superfícies Acqua do que nas superfícies Neoporos, estando de acordo com os resultados apresentados no presente estudo. As superfícies Acqua mostraram, ainda, maior atividade de mineralização e maior expressão de mRNA dos genes de fosfatase alcalina e sialoproteína óssea, sugerindo maior diferenciação de CTM em osteoblastos nestas superfícies.

O gene da fosfatase alcalina é um marcador precoce da diferenciação de osteoblastos, enquanto que o gene da sialoproteína óssea é considerado como um marcador tardio da diferenciação de osteoblastos e sua expressão caracteriza o início do processo de mineralização sobre a matriz de colágeno ósseo (Mendonça et al. 2013). A expressão de fosfatase alcalina aumenta com a variação de topografia de superfície, juntamente com outras genes que codificam outras proteínas como sialoproteína óssea, osteopontina e osteocalcina, as quais estão envolvidas com o desenvolvimento do fenótipo ósseo (Cooper et al. 2006).

As células osteoblásticas utilizadas neste estudo foram de linhagem primária obtida a partir de alvéolos de extração em cicatrização (Passanezi et al. 1989; Ferraz 2009; Sant'Ana et al. 2012). Essas células se caracterizam por taxa de proliferação compatível com células osteoblásticas, menor do que aquelas apresentadas por fibroblastos, e por atividade de fosfatase alcalina e mineralização, mesmo quando cultivadas em meio não osteogênico (Valdivia 2013). Esses achados sugerem diferenciação das células em cultura em fenótipo de osteoblastos, embora diferentes estudos prévios tenham relatado a presença de células osteoprecursoras, menos diferenciadas, no interior de alvéolos em cicatrização (Evian et al. 1982; Amler 1984; Cardaropoli et al. 2003, 2005; Penteado et al. 2005; Heberer et al. 2012).

A formação óssea ao redor de implantes de titânio ocorre de forma similar ao processo de reparo de fraturas, ou seja, através de uma série de eventos superpostos (inflamação, proliferação e remodelamento). Para que ocorra, as células devem ter a capacidade de se aderir sobre a superfície do implante com o objetivo de desenvolver matriz extracelular específica que sofre, posteriormente, processo de mineralização, resultando na interface osso-implante (Palmquist et al. 2010; Gardin et al. 2014).

Células derivadas de tecido ósseo expressam *in vitro* tecido semelhante a osso, após a adição de ácido ascórbico e β -glicerofosfato ao meio de cultura, quando se observa a formação de nódulos mineralizados e a presença de colágeno tipo I, osteonectina e atividade de fosfatase alcalina (Ecarot-Charrier et al. 1983; Bellows et al. 1986). As células GO-1 utilizadas neste estudo também apresentaram a capacidade de formação de nódulos mineralizados e atividade de fosfatase alcalina *in vitro* quando cultivadas em frascos de cultura de tecido em meio convencional (DMEM suplementado por SFB a 10% e solução antibiótica-antimicótica) e meio osteogênico (DMEM suplementado por β -glicerofosfato e ácido ascórbico).

A adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos é bastante sensível à microtopografia de superfície (Martin et al. 1995). Em superfícies mais rugosas, os osteoblastos assumem morfologia mais diferenciada, reduzindo a taxa de adesão à superfície (Boyan et al. 2003), como observado para as superfícies NP, as quais apresentaram a maior rugosidade superficial neste estudo. Quando as células conseguem se aderir, apresentam menor taxa de proliferação e expressão aumentada de marcadores de diferenciação osteoblástica (Boyan et al. 2003; Lossdörfer et al. 2004). As superfícies NP apresentaram atividade de mineralização *in vitro* semelhante às superfícies ACQ e JATO, moderadamente rugosas, e ligeiramente superior ($p > 0.05$) às superfícies L. Entretanto, pode-se observar neste estudo que houve maior atividade de mineralização aos 14 e 28 dias de avaliação para as superfícies moderadamente rugosas, com diferenças significantes da superfície ACQ em relação à superfície L aos 14 dias de avaliação, sugerindo maior estímulo desta superfície também à diferenciação celular.

Células osteoblásticas cultivadas em superfícies ósseas reabsorvidas por osteoclastos mostraram comportamento semelhante ao descrito anteriormente (Boyan et al. 2003b), o que demonstra a importância das características de microtopografia de superfície na remodelação óssea *in vivo*. Assim, essas características podem modular a capacidade de síntese e secreção por osteoblastos de substâncias que favoreçam a osteogênese ao mesmo tempo em que inibam a formação e a atividade de osteoclastos. Implantes de superfícies mais rugosas ($Ra \geq 4 \mu m$) mostraram diminuição do número de células osteoblásticas maduras e imaturas de linhagens humanas ou animais ou ainda estabelecidas a partir de cultura primária de seres humanos aderidas ao disco, porém com maior produção de fatores locais relacionados à diferenciação de osteoblastos, como OPG, $1\alpha 25(OH)2D3$, TGF- $\beta 1$ e PGE $_2$ (Boyan et al. 2003). Esses

fatores podem explicar o maior percentual de contato osso-implante observado em superfícies mais rugosas (Wennerberg, Albrektsson 2009_{a,b} Alla et al. 2011), favorecendo a osteogênese.

Outros estudos empregaram metodologia semelhante aos ensaios realizados neste estudo para investigar a influência de diferentes tratamentos da superfície de implantes de titânio na adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos (Ecarot-Charrier et al. 1983; Boyan et al. 2003; Bang et al. 2014). Observou-se, semelhante às superfícies Acqua investigadas neste estudo, maior atividade de mineralização e fosfatase alcalina em superfícies hidrofílicas, assim como maior expressão de Runx2, osteopontina e osteocalcina, sugerindo que as superfícies hidrofílicas promovem efeitos osteogênicos e evitam a diferenciação de osteoclastos. Esses achados poderiam sugerir que estas superfícies poderiam contribuir para a manutenção do nível ósseo marginal (Bang et al. 2014). Marcadores de diferenciação de osteoblastos também foram expressos em células tronco mesenquimais derivadas de adipócitos cultivadas sobre implantes de titânio de superfícies jateadas e tratadas por ácido, incluindo colágeno 1A1, osteopontina, atividade de fosfatase alcalina e Runx-2, o que indica que esses tratamentos de superfície aumentam a capacidade de indução óssea dos implantes de titânio (Gardin et al. 2014; Mendonça et al. 2008, 2009).

Posteriormente, estudos *in vivo* realizados em modelos animais e em seres humanos deram suporte aos achados *in vitro*. O tratamento químico de superfícies jateadas e tratadas por ácido foi conseguido por meio de submersão dos implantes em solução de NaCl, com o objetivo de evitar contaminação a partir de moléculas presentes na atmosfera (Buser et al. 2004), o que pode explicar a presença de sódio e cloro na superfície dos discos ACQ observada por meio de EDS. O tratamento químico das superfícies de titânio altera suas propriedades de superfície, tais como topografia, estrutura, composição química, energia de superfície e molhabilidade, estando essas últimas relacionadas com melhor interação entre a superfície e seu ambiente biológico (Schwarz et al. 2009). A resposta dos osteoblastos na diferenciação e síntese de matriz extracelular é dependente do grau de diferenciação da linhagem de osteoblastos utilizada, o que pode ser parcialmente modulado pela molhabilidade de superfície (Gittens et al. 2013). Embora não avaliado neste estudo, pode-se observar que os implantes de superfície Acqua apresentam maior molhabilidade (Figura 8A) do que os demais discos, o que poderia estar relacionado à maior adesão de células osteoblásticas observadas nestas superfícies.

Adicionalmente, diferentes estudos demonstraram que superfícies de implantes usinadas, jateadas e condicionadas com ácido (SLA) e jateadas, condicionadas com ácido e modificadas quimicamente (SLAmod) influenciaram a diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoblastos, conforme mensurado por meio de atividade de fosfatase alcalina, expressão de Runx-2 e osteocalcina (Olivares-Navarrete et al. 2010; Mendonça et al. 2010_b).

Estudos realizados em animais demonstraram que a superfície quimicamente modificada apresentou maior percentual de contato osso-implante (BIC) do que superfícies jateadas e condicionadas com ácido durante as primeiras semanas de osseointegração (Buser et al 2004; Klein et al. 2013), o que indica que essas superfícies favorecem a osteogênese direta reduzindo o tempo de osseointegração em seres humanos (Ganeles et al. 2008; Lang et al. 2011). Os resultados obtidos no presente estudo corroboram esses achados, visto que houve maior estímulo à adesão e proliferação de células osteoblásticas sobre as superfícies quimicamente modificadas, assim como maior percentual de área mineralizada.

A capacidade de expressão de fosfatase alcalina pelas células GO-1 em meio osteogênico e convencional confirmam os achados de estudos anteriores, incluindo ensaios de identificação de linhagem de células osteoprogenitoras (PENTEADO et al, 2005; VALDÍVIA, 2013). A superfície hidrofílica ACQ determina melhor adesão celular inicial, estando mais associada com o processo de diferenciação celular, diferentemente das superfícies rugosas, que parecem estar mais relacionadas com o processo de mineralização (MENDONÇA et al, 2013; SOARES et al, 2013). Nesse sentido, seria esperado que a expressão de fosfatase alcalina do grupo ACQ GO-1 (células de granulação óssea em discos de titânio com superfície Acqua) fosse mais expressiva em meio convencional (DMEM) em comparação aos grupos NP GO-1 (células de granulação óssea em discos de titânio com superfície NeoPoros) e JATO GO-1 (células de granulação óssea em discos de titânio com superfície jateada) em mesmo meio de cultivo, da mesma maneira que seria esperado que sua menor expressão em meio osteogênico também fosse creditada ao grupo ACQ GO-1, quando comparado com os demais grupos de superfícies rugosas (NP GO-1 e JATO GO-1). Pivodova e colaboradores (PIVODOVA et al, 2013) observaram em seu estudo diminuição de expressão de fosfatase alcalina decorridas 72h de cultivo, demonstrando que os tratamentos físicos de superfícies, tais como rugosidade de superfície, determinam maior importância na osteogênese do que os tratamentos químicos das superfícies de titânio, tais como condicionamento ácido e alcalino. Esse estudo corrobora os presentes resultados, já que as

superfícies hidrófilas, ao mesmo tempo que aprimoram a adesão celular, podem ser capazes de diminuir ligeiramente a expressão da fosfatase.

Entretanto, a maior quantidade expressada de fosfatase alcalina do presente estudo em meio convencional foi determinada nos discos de superfície lisa. Dentre as hipóteses que podem explicar esse fenômeno, contrário a maioria dos resultados descritos na literatura para longos períodos de incubação - 7 a 14 dias (PALAIOLOGOU et al, 2001; KIM, CHOI, KIM, 2006; ZHAO et al, 2006; ALVES & WASSALL, 2009; SHAPIRA & HALABI, 2009; MENDONÇA et al, 2010; MENDONÇA et al, 2013; SOARES et al, 2013), está o fato de que as rugosidades na superfície de titânio geradas por redução ácida levam à uma significativa diminuição da proliferação de células tronco-mesenquimais (TAKEUCHI et al, 2005; PIVODOVA et al, 2013), as células de eleição desta pesquisa. As presentes células submetidas ao ensaio de fosfatase alcalina poderiam ser equiparadas àquelas descritas por Martin e colaboradores (MARTIN et al, 1995), que observaram grupos celulares isolados com tendência a diminuir expressão da fosfatase de acordo com o aumento da rugosidade de superfície. Outra explicação para o fenômeno pode ser pautada na execução do presente experimento: para a realização deste ensaio, a coleta das amostras sobre os discos de titânio de superfície lisa foi mecanicamente determinada com facilidade, visto observação de camada celular distinta; nos discos com tratamento de superfície, entretanto, a remoção das amostras deu-se com maior dificuldade, provavelmente devido à própria textura superficial dos mesmos. Dessa maneira, pode ter ocorrido uma subtração amostral, determinando maior quantidade celular nos experimentos referentes à superfície lisa.

Os implantes usinados, de superfície mais lisa, foram utilizados nesse estudo como controle comparativo. Os resultados obtidos mostraram maior adesão e proliferação de fibroblastos do que de osteoblastos sobre esse tipo de superfície, comprovando sua biocompatibilidade, porém sendo menos favorável à adesão de células osteoblásticas e, conseqüentemente, à osteogênese. Dorkhan et al. (2014) demonstraram que a adesão de ceratinócitos e fibroblastos gengivais humanos é ligeiramente maior em superfícies de titânio usinadas do que nano-estruturadas, como observado em nosso estudo.

Essas superfícies foram testadas em outros estudos (Alves, Wassal 2009), cujos resultados demonstraram adesão de osteoblastos depois de 24 horas do cultivo inicial, com espalhamento sobre os implantes após 48 horas e proliferação de células grandes e achatadas após 72 horas.

Diferentes métodos podem ser utilizados para investigação das características de rugosidade superficial, incluindo microscopia de força atômica (Wennerberg 1996, 1998), confocal (Wennerberg 1996, 1998), microscopia eletrônica de varredura (Mustafa et al. 2001; Calvo-Guirado et al. 2015), perfilometria (Mustafa et al. 2001; Liu et al. 2013; Elias et al. 2015) e interferometria de luz branca (Gasik et al. 2015; Calvo-Guirado et al. 2015).

Hallgreen et al (2001) avaliaram a topografia de superfície de implantes fabricados com orientação topográfica vertical (n= 20) ou horizontal (n= 20) em diferentes escalas, usando três equipamentos: perfilômetro mecânico, confocal e microscópio de força atômica, os quais demonstraram que os implantes com topografia orientada horizontalmente tinham superfície mais lisa, sugerindo que as características de anisotropia e isotropia também influenciam as características de rugosidade superficial, embora não influenciem o percentual de contato osso-implante ou a força de remoção ao torque quando instalados na tíbia de coelhos.

A maioria das superfícies dos implantes é anisotrópica, ou seja, apresentam diferentes padrões de orientação de superfície, como pode se observar nas Figuras 10 a 13 e 18 a 21. Assim, a investigação das características de superfície nas imagens escaneadas poderia eliminar a variação relacionada ao sentido em que a rugosidade de superfície foi medida. Neste estudo, a investigação das características de rugosidade superficial foi feita por meio de um *plugin* do programa ImageJ, chamado de SurfCharJ, desenvolvido por diferentes cientistas e utilizado inicialmente para análise de rugosidade de superfície de tipos de papel (Chinga et al. 2007). Esse *plugin* foi anteriormente utilizado para caracterização de estruturas de liga de titânio e apresenta como princípios avaliação de superfície fornecendo análise de rugosidade local e global, gradiente de análise, segmentação de domínios, nivelamento de superfície e análise direcional (Safdar 2010).

Até onde se tenha conhecimento, as características de superfície de implantes odontológicos não foram investigadas por meio deste *software*. Devido a problemas técnicos ocorridos durante a execução da pesquisa, optou-se pela análise de superfície dos discos por meio do *plugin* SurfCharJ. Pode-se observar que os parâmetros de rugosidade investigados diferem em números dos relatos de literatura, porém permitem a comparação entre os grupos. Neste estudo, a superfície mais lisa foi apresentada pelos discos usinados, enquanto que as superfícies jateada e Acqua apresentaram rugosidade moderada e semelhante entre si e as superfícies Neoporos apresentaram maior rugosidade.

Não foram observadas diferenças significativas na estrutura superficial dos diferentes grupos, com exceção do achatamento (Rsv). Outros estudos (Mendonça et al. 2013) também não observaram diferenças ultra-estruturais significantes entre implantes de diferentes tratamentos superficiais, apenas quando imagens em grandes aumentos foram obtidas (ex.: 50000 vezes). Neste aumento, uma superfície reticulada a nível manométrico foi observada para a superfície hidrofílico. Segundo o fabricante, a rugosidade dos implantes de superfície Acqua é moderada, com $Sa = 1,4 - 1,8 \mu m$ e $Sz = 15 \mu m$, conforme observado em microscopia confocal de varredura.

Usualmente, os principais parâmetros utilizados na pesquisa em implantes endósseos são os valores de Ra, baseados em estruturas bidimensionais, os quais parecem estar correlacionados ao grau de osseointegração (Buser et al. 1991; Wennerberg 1996; Wennerberg et al. 1998; Gotfredsen et al. 2000). Mais recentemente, foi proposta a avaliação tridimensional das superfícies (Wennerberg, Albrektsson 2009), especialmente os valores de Sa. Liu et al. (2013) compararam a rugosidade superficial de implantes líderes de mercado (Astra, 3i, Straumann e Nobel) nos flancos, topos e vales e, pela primeira vez, foram observadas diferenças nas rugosidades de superfície dos implantes Nobel e Straumann. Os implantes Biomet 3i apresentaram, dentre todos, a superfície mais lisa em todos os sítios de avaliação, enquanto os implantes Astra e Straumann apresentaram rugosidade intermediária, seguido dos implantes Nobel. Similarmente ao nosso estudo, os implantes de rugosidade intermediária apresentaram o maior número de células osteoblásticas aderidas.

As características de rugosidade de superfície dos cinco maiores fabricantes de implantes no Brasil foram investigadas recentemente (Rosa et al. 2013) utilizando interferômetro, equipamento recomendado para avaliar a rugosidade de implantes com roscas no nível micrométrico, em três localizações/implante: topos, vales e flancos das roscas. Foram investigados parâmetros tridimensionais de rugosidade superficial, incluindo Sa (média aritmética do desvio de altura em relação ao plano médio), Sds (densidade, ou seja, número de picos por unidade de área), Sdr (proporção entre área de superfície tratada e área achatada de referência). Foi identificado que os implantes jateados e condicionados por ácido da Neodent apresentam valores de Sa de $0,66$ a $0,75 \mu m$, dependendo do tipo. Esses valores foram inferiores aos implantes Straumann SLA, usados como controle para comparação ($1,53 \mu m$) e aos implantes Titaniumfix ($0,90 \mu m$), porém superiores aos implantes Biomet 3i Bonelike ($0,47-0,53 \mu m$), fabricado no Brasil. Esses parâmetros não foram investigados no presente estudo, mas permitem estabelecer comparação com outros sistemas conhecidos.

Dentro dos limites desse estudo, pode-se observar que as superfícies moderadamente rugosas favorecem a adesão e proliferação de células osteoblásticas, assim como de fibroblastos gengivais humanos, podendo favorecer a osteogênese *in vivo*. São necessários outros estudos *in vitro* e *in vivo* para melhor avaliar as propriedades de superfície dos implantes investigados e sua influência no percentual de contato osso-implante e osteogênese *in vivo*.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Dentro das limitações desse estudo pode-se concluir que:

- Células de linhagem fibroblástica e osteoblástica humana apresentam melhor adesão e proliferação sobre superfícies de titânio comercialmente puro (graus I a IV) moderadamente rugosas;
 - As superfícies hidrofílicas (Acqua - Neodent, Curitiba, PR, Brasil) favorecem maior adesão e proliferação de células osteoblásticas comparativamente a células fibroblásticas e aos demais tratamentos de superfície;
 - Há maior rugosidade superficial com os discos de superfície Neoporos (Neodent, Curitiba, PR, Brasil), rugosidade moderada com os discos de superfície lisa (Acqua e jateados) e menor rugosidade com os discos usinados apenas;
 - O tratamento das superfícies por uso de substâncias ácidas altera ligeiramente a composição química dos discos de titânio;
 - Células fibroblásticas apresentam maior taxa de proliferação e adesão aos discos do que células osteoblásticas;
 - Todas as superfícies mostraram formação de nódulos mineralizados in vitro, com maior percentual de área mineralizada sobre as superfícies Acqua, especialmente quando comparada às superfícies lisas.
 - A atividade de fosfatase alcalina foi mais expressiva em superfícies lisas e hidrofílicas (Acqua) com células de linhagem osteoblástica em meio de cultivo convencional.
-
-

REFERÊNCIAS

REFERENCIAS

Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. *Acta Orthop Scand* 1981; 52: 155–170.

Albrektsson T, Buser D, Sennerdy L. On crestal/marginal bone loss around dental implants. *Int J Periodont Rest Dent*. 2013; 33(1): 9-11.

Albrektsson T, Jacobsson M. Bone–metal interface in osseointegration. *J Prosthet Dent* 1987; 57: 597–607.

Albrektsson T, Sennerdy L, Wennerberg A. State of the art of oral implants. *Periodontology* 2000. 2008; 47: 15-26.

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

Albrektsson T, Buser D, Sennerdy L. On crestal/marginal bone loss around dental implants. *Int J Periodont Rest Dent*. 2013; 33(1): 9-11.

Alla RK, Ginjupalli K, Upadhya N, Shammash M, Ravi RK, Sekhar R. Surface roughness of implants: a review. *Trends Biomater Artif Organs* 2011; 25: 112-118.

Alves SF, Wassall T. In vitro evaluation of osteoblastic cell adhesion on machined osseointegrated implants. *Braz Oral Res* 2009; 23: 131-136.

Amler MH. Age factor in human alveolar bone repair. *J Oral Implantol* 1993;19:138-142.

Anselme K, et Al. The relative influence of the topography and chemistry of titanium surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials* 2000; 21: 1567-1577.^a

Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 2000 v. 21, n. 7, p. 667-681, 2000. ^b

Bagno A, Di Bello C. Surface treatments and roughness properties of titanium-based biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 2004;15:935–949.

Bang S-M, Moon H-J, Kwon Y-D, Yoo J-Y, Pae A, Kwon IK. Osteoblastic and osteoclastic differentiation on SLA and hydrophilic modified SLA titanium surfaces. *Clin. Oral Impl. Res.* 25, 2014, 831–837

Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM, et al. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically-released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* 1986; 38: 143.

Boyan BD, Lossdorfer S, Wang L, Zhao G. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur Cells Mat* 2003; 5(2): 11-12._a

Boyan BD, Schwartz Z, Lohmann CH, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, Puzas JE. Pretreatment of bone with osteoclasts affects phenotypic expression of osteoblast-like cells. *J Orthop Res* 2003; 21: 638-647._b

Bryington M, Mendonça G, Nares S, Cooper LF. Osteoblastic and cytokine gene expression of implant-adherent cells in humans. *Clin. Oral Impl Res* 2014; 25: 52–58.

Buser D, Brogini N, Wielend M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann SG. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 2004; 83: 529-533.

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

Calvo-Guirado JL, Satorres-Nieto M, Aguilar-Salvatierra A; Delgado-Ruiz RA; de Val JEM-S; Gargallo-Albiol J, Gómez-Moreno G; Romanos GE. Influence of surface treatment on osseointegration of dental implants: histological, histomorphometric and radiological analysis in vivo. *Clin Oral Invest* 2015; 19: 509-517.

Cardaropoli G, Araújo M, Hayacibara R, Sukekava F, Lindhe J. Healing of extraction sockets and surgically produced – augmented and non-augmented – defects in alveolar ridge. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 435-440.

Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 809–818.

Chinga G, Johnsen PO, Dougherty R, Berli EL, Walter J. Quantification of the 3D microstructure of SC surfaces. *J Microscopy* 2007; 227 (Part 3): 254-265.

Cooper LF, Zhou Y Takebe J, Guo J, Abron A, Holmen A, et al. Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. *Biomaterials* 2006; 27: 926-936.

Dorkhan M, Yücel-Lindberg T, Hall J, Svensäter G, Davies JR. Adherence of human oral keratinocytes and gingival fibroblasts to nano-structured titanium surfaces. *BMC Oral Health* 2014, 14:75. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1472-6831/14/75>.

Ecarot-Charrier B, Glorieux FH, Van der Rest M, et al. Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol* 1983; 96: 639-643.

Elias C N, Meirelles L. Improving Osseointegration of Denal Implants. *Exp Rev Med Dev* 2010; 7(2): 241-256.

Elias CN, Fernandes DJ, Resende CRS, Roestelb J. Mechanical properties, surface morphology and stability of a modified commercially pure high strength titanium alloy for dental implants. *Dental Mat* 2015; 31: e1-e13.

Evian CI, Rosenberg ES, Coslet JG, Corn H. The osteogenic activity of bone removed from healing extraction sockets in humans. *J Periodontol* 1982;53: 81-85.

Ferraz BFR. Recobrimento radicular: avaliação clínica de nova abordagem terapêutica regenerativa em humanos. Acompanhamento longitudinal de 9 meses. Mestrado (Dissertação). Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo. Bauru, SP, 2009. 121p.

Ganeles J, Zöllner A, Jackowski J, ten Bruggenkate C, Beagle J, Guerra F. Immediate and early loading of Straumann implants with a chemically modified surface (SLActive) in the posterior mandible and maxilla: 1-year results from a prospective multicenter study. *Clin Oral Impl Res* 2008; 19: 1119–1128.

Gardin C, Ferroni L, Bressan E, Calvo – Guirado, JL, Degidi M, Piattelli A, Zavan B. Adult stem cells properties in terms of commitment, aging and biological safety of grit-blasted and acid-etched ti dental implants surfaces. *Int J Mol Cell Med Autumn* 2014; 3: 225-236.

Gasik M, Braem A, Chaudhari A, Duyck J, Vleugels J. Titanium implants with modified surfaces: meta-analysis of in vivo osteointegration. *Mat Sci Engin C* 2015; 49: 152-258.

Giavaresi G, Fini M, Cigada A, Chiesa R, Rondelli G, Rimondini L, Vicoli Aldini N, Martini L, Giardino R. Histomorphometric and microhardness assessments of sheep cortical bone surrounding titanium implants with different surface treatments. *J Biomed Mater Res* 2003; 67A: 112–120.

Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Cheng A, Anderson DM, McLachlan M, Stepham I, Geis-Gerstorfer J, Sandhage KH, Fedorov AG, Rupp F, Boyan BD, Tannenbaum R, Schwartz Z. The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells. *Acta Biomater* 2013; 9: 6268-6277.

Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Tannenbaum R, Boyan BD, Schwartz Z. Electrical implications of corrosion for osseointegration of titanium implants. *J Dent Res* 2011 Dec; 90: 1389-97.

Gotfredsen K, Berglundh T, Lindhe J. Anchorage of titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res* 2000; 2:120–128.

Hallgren C, Sawase T, Ortengren U, Wennerberg A. Histomorphometric and mechanical evaluation of the bone-tissue response to implants prepared with different orientation of surface topography. *Clin Impl Dent Rel Res* 2001; 3: 194-203.

Hazan R, Brener R, Oron U. Bone growth to metal implants is regulated by their surface chemical properties. *Biomaterials* 1993; 14: 570–574.

Heberer S, Wustlich A, Lage H, Nelson JJ, Nelson K. Osteogenic potential of mesenchymal cells embedded in the provisional matrix after a 6-week healing period in augmented and non-augmented extraction sockets: an immunohistochemical prospective pilot study in humans. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(1):19-27

Heo Y-Y, Um S, Kim S-K, Park J-M, Seo B M. Responses of periodontal ligament stem cells on various titanium surfaces. *Oral Diseases*. 2011; 17:320-327.

Huang H H, Ho C T, Lee T H, Lee T L, Liao K K, Chen F L. Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. *Biomol Eng*. 2004; 21(3-5): 93-97.

Jarmar T, Palmquist A, Branemark R, Hermansson L, Engqvist H, Thomsen P. Characterization of the Surface properties of commercially available dental implants using scanning electron microscopy, focused ion beam, and high resolution transmission electron microscopy. *Clin Impl Dent Rel Res* 2008; 10(1): 11-22.

Jayaraman M, Meyer U, Bühner M, Joos U, Wiesmann H-P. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 2004; 25: 625-631.

Kim MJ, Choi MU, Kim CW. Activation of phospholipase D1 by surface roughness of titanium in MG63 osteoblast-like cell. *Biomaterials* 2006;27:5502–5511.

Kim YH, Koak JY, Chang IT, Wennerberg A, Heo SJ. A histomorphometric analysis of the effects of various surface treatment methods on osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18: 349–356.

Klein MO, Bijelc A, Ziebart T, Koch F, Kämmerer PW, Wieland M, Konerding MA, Al-Nawas B K. Submicron scale-structured hydrophilic titanium surfaces promote early osteogenic gene response for cell adhesion and cell differentiation. *Clin Impl Dent Rel Res* 2013; 15: 166-175.

Lang NP, Salvi GE, Huynh-Ba G, Ivanovski S, Donos N, Bosshardt DD. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin. Oral Impl. Res* 2011; 22: 349–356.

Lange R, Luthen F, Beck U, Rychly J, Baumann A, Nebe B. Cell–extracellular matrix interactions and physiochemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. *Biomol Eng* 2002; 19: 255–261.

Larsson C et al. Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. *Biomaterials* 1996; 17: 605–616.

Lavenus S, Pilet P, Guicheux J, Weiss P, Louam G, Layrolle P. Behaviour of mesenchymal stem cells, fibroblasts and osteoblasts on smooth surfaces. *Acta Biomater* 2011; 7: 1525-1534.

Le Guehennec L, Lopez-Heredia M A, Enkel B, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomater*. 2008; 4(3): 535-543.

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; 22: 641-651.

Lossdörfer S, Schwartz Z, Wang L, Lohmann CH, Turner JD, Wieland M, Cochran DL, Boyan BD. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *J Biomed Mater Res A*. **2004** Sep 1;70(3):361-9.

Lüthen F, Lange R, Becker P, et al. The influence of surface roughness of titanium on b1 and b3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells. *Biomaterials*. 2005;26: 2423–2440.

Magnani A, Priamo A, Pasqui D, Barbucci R. Cell behavior on chemically microstructured surfaces. *Mater Sci Eng C* 2003; 23: 315–328.

Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res* 1995; 29: 389-401.

Mendonça DBS, Miguez PA, Mendonça G, Yamauchi M, Aragão FJL, Cooper LF. Titanium Surface topography affects collagen biosynthesis of adherent cells. *Bone* 2011; 49: 463-472.

Mendonça G, Mendonça BS, Simões LGP, Araújo AL, Leite ER, Duarte WR, Aragão FJL, Cooper LF. The effects of implant Surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. *Biomaterials* 2009; 30: 4053-4062. _a

Mendonça G, Mendonça DBS, Araújo MAR, Duarte WR, Cooper LF, Aragão FJL. Avaliação do comportamento de células mesenquimais humanas sobre superfícies de implantes dentários. *ImplantNews*. 2009; 6(2): 137-141. _b

Mendonça G, Mendonça DBS, Aragão FJL, Cooper LF. The combination of micron and nanotopography by H₂SO₄/H₂O₂ treatment and its effects on osteoblast-specific gene expression of hMSCs. *J Biomed Mater Res* 2010; 94A: 169-179. _a

Mendonça G, Mendonça DBS, Oliveira LS, Araújo CA. Efeitos da diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas sobre superfícies hidrofílicas. *ImplantNews* 2013; 10 (6 Part A): 111-116.

Mendonça G, Mendonça DBS, Simões LGP, Araújo AL, Goln AL, Duarte WR, Cooper LF, Aragão FJL. Efeito de superfícies de implantes nano-estruturadas na expressão de genes de osteoblastos e no contato osso-implante in vivo. *Rev Odontol Bras Central* 2010; 19 (50): 196-204. _b

Mendonça G¹, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials*. 2008 Oct;29(28):3822-35.

Mustafa K¹, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez BS, Arvidson K. Determining optimal surface roughness of TiO(2) blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Implants Res*. 2001 Oct;12(5):515-25.

Nebe B, Lüthen F, Lange R, et al. Topography-induced alterations in adhesion structures affect mineralization in human osteoblasts on titanium. *Mater Sci Eng*. 2004;24:619–624.

Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Hutton DL, Erdman CP, Wieland M, Boyan BD, Schwartz Z. Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of

mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. *Biomaterials* 2010; 31: 2728-2735.

Palaiologou AA, Yukna RA, Moses R, Lallier TE. Gingival, dermal, and periodontal ligament fibroblasts express different extracellular matrix receptors. *J Periodontol* 2001;72:798–807.

Palmquist A, Omar OM, Esposito M, et al. Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome. *J R Soc Interface* 2010;7 Suppl 5:S515-27.

Passanezi E, Janson WA, Nahás D, Campos Jr A. Newly forming bone autografts to treat periodontal infrabony pockets: clinical and histological events. *Int J Periodontics Rest Dent*. 1989; 9(2): 140-151.

Penteado R, Romito GA, Pustiglioni FE, Marques MM. Morphological and proliferative analysis of the healing tissue in human alveolar sockets covered or not by an e-PTFE membrane: a preliminary immunohistochemical and ultrastructural study. *Braz J Oral Sci*. 2005;4:664-669.

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

Rosa AL, Crippa GE, De Oliveira PT, Taba M Jr, Lefebvre L-P, Beloti MM. Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. *Clin Oral Impl Res* 2009; 20: 472–481.

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 Impl* 2013; 28: 358-365.

Rupp F, Scheideler L, Rehbein D, Axmann D, Geis-Gerstorfer J. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modification. *Biomaterials* 2004; 25: 1429–1438.

Safdar A. Microstructures and surface roughness of EBM produced Ti-6Al-4V. *Dissertação (Licenciatura). Ciência dos Materiais, Universidade de Malmö. Malmö, Suécia, 2010.*

Sant'ana AC, Ferraz BF, de Rezende ML, Gregghi SL, Damante CA, Passanezi E. Newly forming bone graft: a novel surgical approach to the treatment of denuded roots. *J Appl Oral Sci*. 2012 May-Jun; 20(3): 392–398.

Sammons RL, Lumbikanonda N, Gross M, Cantzler P. Comparison of osteoblast spreading on microstructured dental implant surfaces and cell behaviour in an explant model of

osseointegration: a scanning electron microscopic study. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16: 657-666.

Schwarz F, Wieland M, Schwartz Z, Zhao G, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Schedle A, Broggini N, Bornstein M, Buser D, Ferguson SJ, Becker J, Boyan BD, Cochran DL. Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2009; 88B: 544-557.

Shapira L, Halabi A. Behavior of two osteoblast-like cell lines cultured on machined or rough titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:50–55.

Soares PBF, Moura CCG, Coró CGC, Reis MVP, Zanetta-Barbosa D, Soares CJ. Biological characterization of implant surfaces – In vitro study. *Dental Mat* 2013; 29(Suppl): e28. [dx.doi.org/10.1016/j.dental.2013.08.059](https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.08.059).

Steinemann SG. Titanium—The material of choice? *Periodontol* 2000 1998;17:7–21.

Takeuchi K, Saruwatari L, Nakamura HK, Yang JM, Ogawa T. Enhanced intrinsic biomechanical properties of osteoblastic mineralized tissue on roughened titanium surface. *J Biomed Mater Res A* 2005;72:296–305.

Valdivia MAM. Cultura e caracterização de células da granulação óssea in vitro: efeitos proliferativos estimulados por diferentes biomateriais. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Bauru, 2013.

Vallés G, Gil-Garay E, Munuera L, et al. Modulation of the cross-talk between macrophages and osteoblasts by titanium based particles *Biomaterials*. 2008; 29:2326–2335.

Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone. *Impl Res*. 2009a; 20(Suppl 4): 172-184.

Wennerberg A, Albrektsson T. On implants surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009b; 24: 63-74.

Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Implants Res* 1998; 9:11–19.

Wennerberg A. On surface roughness and implant incorporation. Tese (Doutorado). Department of Biomaterial/Handicap Research, University of Göteborg. Göteborg, Sweden, 1996.

Wennerberg et al. Nanoporous tio2 thin film on titanium oral implants for enhanced human soft tissue adhesion: a light and electron microscopy study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2011; 13(3): 184-196.

Yamano S, Ma A K, Shanti R M, Kim S W, Wada K, Sukotjo C. The influence of different implant materials on human gingival fibroblast morphology, proliferation, and gene expression. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011 Nov-Dec; 26(6): 1247-1255.

Zhao G ZO, Schwartz Z, Wieland M, Landolt D, Boyan BD. Osteoblastlike cells are sensitive to submicron-scale surface structure. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:258–264.

Zizzari VL¹, Marconi GD, De Colli M, Zara S, Zavan B, Salini V, Fontana A, Cataldi A, Piattelli A. In Vitro Behavior of Primary Human Osteoblasts Onto Microrough Titanium Surface. *Implant Dent*. 2015 Apr 24.

ANEXOS

ANEXO A –

Aspecto das células GO em cultura com meio DMEM,
observado em microscópio de fase.

ANEXO B –

Aspecto das células GO em cultura com meio OSTEOGÊNICO,
observado em microscópio de fase.

ANEXO C –

ANEXO D –

Aspecto das células GO envolta do dico apos fixação com formol 4% para ensaio de mineralização, observado em microscópio de fase.

Aspecto dos discos de Titânio puro utilizados no experimento, de esquerda a direita superfície Lisa, Jateada, Neoporos e Acqua.

ANEXO E –

Folha de aprovação do Comitê de Ética

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Adesão, proliferação e atividade de mineralização de células da granulação óssea e fibroblastos gengivais humanos em discos de titânio com diferentes superfícies de tratamento: análise in vitro

Pesquisador:

Versão: Adriana Campos Passanezi Sant'Ana

CAAE: 3

32274414.9.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 048443/2014

Patrocinador Principal: JJGC INDUSTRIA E COMERCIO DE MATERIAIS DENTARIOS S.A

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: cep@fob.usp.br