



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



MORGANA SIQUEIRA LIMA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA
BIOCOMPATIBILIDADE DE DISCOS DE
TITÂNIO ENRIQUECIDOS E MODIFICADOS
POR IONIZAÇÃO (EDM) EM CULTURA DE
OSTEOBLASTOS.**

UBERLÂNDIA

2018

MORGANA SIQUEIRA LIMA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA
BIOCOMPATIBILIDADE DE DISCOS DE
TITÂNIO ENRIQUECIDOS E MODIFICADOS
POR IONIZAÇÃO (EDM) EM CULTURA DE
OSTEOBLASTOS.**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado a Faculdade de
Odontologia da UFU, como requisito
parcial para obtenção do título de
Graduado em Odontologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flaviana
Soares Rocha

Co-orientadora: Prof^a. Letícia de
Souza Castro Filice

UBERLÂNDIA

2018

“Nada é em vão. Se não é benção é lição.”

Dedico essa conquista à minha vizinha Noide.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Prof. Flaviana Soares, por aceitar me orientar, pelo exemplo de excelência e organização, que me ensinou muito. Agradeço imensamente pela oportunidade.

À minha Co orientadora, Letícia Felice, que me deu a primeira oportunidade e que continuou me proporcionando tantas outras, por sempre se mostrar disponível, mas, principalmente, por tanto carinho e atenção.

À Lorraine Braga pelas primeiras oportunidades que proporcionaram tanto aprendizado.

Aos meus pais Iris e Ronaldo, que são a razão e o porquê de toda minha formação pessoal e profissional. Agradeço por seus esforços e por serem a base dos meus sonhos e mesmo assim nunca me cobrar nada além da minha felicidade. Obrigada por todas as privações ao longo da vida, que hoje compreendo são uma expressão do amor de vocês e pelo apoio que nunca me deixou pensar em desistir. Minha infinita gratidão.

Ao meu irmão, por fazer parte de quem eu sou, por tantos momentos vividos, mas principalmente por cuidar de mim, do jeito mais protetor e bonito.

À minha tia Silvia, minha segunda mãe, pelo apoio desde o primeiro momento e a certeza de base enquanto eu precisar, por acreditar em mim mais do que eu mesma e por isso me encorajar tanto, por cuidar de mim como filha, por tudo e por tanto.

Ao meu padrinho, Wilson e prima de Debora, por me acolherem, por todo apoio e carinho.

À minha prima Nathalia, não só por ser um exemplo, mas pela confiança e incentivo que me fez ter coragem para ir atrás dos meus sonhos.

À minha avó Leda, por ser não só meu apoio, mas de toda minha família, por ser a base que deu início a tudo que hoje posso me firmar, por todo amor.

À minha vó Noide, que me faz sentir ainda mais realizada com minha conquista, uma vez que é motivo de tanto orgulho, por me motivar com suas palavras e cuidar de mim pelas suas orações e pelo amor que me dá força.

À minha madrinha, Nalu, por cuidar de mim, do meu emocional e espiritual, por ser luz e por todo apoio.

À minha prima Lorena, por passarmos por tantas coisas juntos e ainda assim continuarmos com o mesmo amor de irmã.

Aos familiares, Tios, Tias e primos, por sermos família linda que só tenho a agradecer.

Aos amigos da 78 que se tornaram família e acrescentaram tanta alegria e companheirismo à graduação. Especialmente à Letícia de Castro e Anne, que foram parceiras, confidentes, por todos momentos juntas.

À minha amiga Gabriely, pela amizade, mas especialmente por ser muito mais do que isso, por fazer com que estar longe de casa fosse mais fácil e por ser um pouco de lar na minha vida, pelo apoio e companheirismo sem fim, que ajudou e ajuda tanto em todos os momentos, sua amizade é um presente.

À Stephanie, que também virou família, que representa luz na minha vida, por uma sintonia tão grande que me ajuda sem mesmo perceber, por me ouvir, me apoiar sempre e independente de qualquer coisa, que me faz perceber que Deus sempre coloca as pessoas certas na minha vida.

À minha parceira de clínica, Fernanda, por todos auxílios e por me ajudar a me tornar uma pessoa melhor.

Ao Felipe, por me quere tão bem e de um jeito tão bonito, por acrescentar ainda mais amor a minha vida. Por ser paciente, meu amigo, meu colo e meu apoio sempre.

À Janaína, que estava do meu lado quando tudo ainda era sonho e que continuou, participou, foi apoio, exemplo e principalmente amiga durante todo tempo.

Aos meus amigos da vida, Igor e Brunna, por serem a certeza de apoio e uma fonte de carinho que sempre posso recorrer, por me ensinar o valor de uma amizade verdadeira, por serem vocês e por se fazerem tão presentes mesmo de longe.

Aos meus sogros, Sérgio e Maria Gorete e meu cunhado, Vinícius, por todo apoio, que ajudou com que eu me sentisse acolhida e cuidada e por isso por tanto ajudarem a tornar tudo mais fácil.

À Isamara, que mostrou que o melhor pode vir da dificuldade, que acrescentou não só alegria na minha casa, mas também à minha vida.

A todos professores da minha formação, especialmente aos meus professores e funcionários da FOUFU, por me proporcionarem uma formação de excelência que eu nem poderia imaginar ter.

Aos pacientes, os que mais devo, que permitiram cada aprendizado e ensinamento e por mostrar a parte mais bonita da odontologia, os maiores responsáveis por me fazer me apaixonar pelo curso, obrigada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia e todos companheiros de cultura e experimentos pelo apoio.

Eu dedico essa conquista a todos vocês e especialmente à Deus por tanto a agradecer!

RESUMO

O titânio (Ti) é o material mais utilizado em implantes intraósseos. Várias tecnologias são desenvolvidas para aprimorar sua superfície, na tentativa de promover melhor e mais rápida osseointegração tal como o enriquecimento do titânio por usinagem com descargas elétricas (EDM). Neste trabalho, foram utilizados 135 discos de liga titânio (Ti6Al4V) comercial puro grau IV ASTM B348 Grau V, distribuídos em 3 grupos: T1- discos de Ti6Al4V, T2- disco de Ti6Al4V usinado e modificado por EDM e T3- disco de Ti6Al4V usinado e dopado com $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Hidroxiapatita). Foram realizados testes de MTT, dosagem de proteína total, fosfatase alcalina e vermelho de alizarina. Foi constatado que as diferentes superfícies implantares proporcionam condições favoráveis para o crescimento celular e proliferação. Não houve diferença significativa na dosagem de proteína total e fosfatase alcalina entre os grupos. A superfície T3 apresentou maior grau de mineralização, quando comparada às superfícies T1 e T2.

Palavras-chave: Osseointegração, EDM, hidroxiapatita, osteoblastos, titânio.

SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas	09
Introdução	10
Justificativa	13
Justificativa da iniciação	13
Justificativa do trabalho	13
Objetivos	14
Metodologia	15
Análise e caracterização dos discos de titânio	15
Cultura de osteoblastos sobre os discos de titânio	15
Viabilidade Celular (Ensaio de MTT)	16
Dosagem de proteína total	16
Dosagem de fosfatase alcalina (ALP)	17
Teste Vermelho de Alisarina	17
Análise estatística	17
Resultados	18
Cultura Celular	19
Viabilidade celular (Ensaio de MTT)	19
Proteína total	20
Dosagem de Fosfatase Alcalina (ALP)	21
Teste Vermelho de Alisarina	22
Discussão	25
Conclusão	27
Referências bibliográficas	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALP- Fosfatase alcalina, uma enzima;

EDM- Técnica alternativa de enriquecimento de titânio por equipamento de usinagem de por descargas elétricas;

HA- Hidroxiapatita;

MC3T3- Linha celular precursora de osteoblastos derivada da calvaria de camundongo;

RA- Rugosidade de superfície dos discos;

Ti6Al4V- Liga titânio comercial pura de Titânio.

1. INTRODUÇÃO

O osso é um tecido vivo, vascularizado e dinâmico, que sofre mudanças ao longo de toda vida do indivíduo. O processo contínuo de remodelação proporciona um mecanismo de cura sem cicatrizes e de regeneração do tecido ósseo danificado (DAVIES, 2007).

A bioengenharia segue constantemente na busca por materiais e substâncias capazes de produzir uma associação mais estável entre células ósseas e ligas metálicas com intuito de reconstruir ou mesmo amenizar defeitos existentes no corpo humano. Na odontologia, tal fenômeno é chamado de osseointegração (BRANEMARK, 1969).

Osseointegração é definida por Branemark (1969) como a justaposição do tecido ósseo sobre o implante analisada em microscopia ótica, sem a interposição de tecido conjuntivo ou fibroso entre o implante e o tecido ósseo sob carga funcional.

Entender como o material influencia e como é influenciado pela resposta biológica resultante deste contato material/sistema biológico, constitui a questão-chave nas aplicações de biomateriais (LAUSMAA, 1996). A biocompatibilidade de um material está altamente relacionada ao comportamento das células em contato e, em particular, à adesão celular na sua superfície (BRACERAS, 2005).

Dentre os materiais, o titânio (Ti) é o mais utilizado em implantes intraósseos (HANSSON et al., 1983). A sua superfície possui a capacidade de receber diferentes tipos de tratamento com o objetivo de melhorar a qualidade da interface e, como defendem alguns pesquisadores, diminuir o tempo não funcional do implante (AMARANTE; LIMA., 2001; CARVALHO et al., 2001).

As características da superfície dos implantes revelam-se importantes uma vez que é nessa zona que ocorrem as reações biológicas que conduzem, quando as condições são favoráveis, à osseointegração (MASSARO, 2002; SADER, 2005)

Na tentativa de melhorar a quantidade e qualidade da interface osso-implante, numerosas modificações de superfície têm sido propostas, sendo muitas destas baseadas na teoria de que uma melhor e mais rápida osseointegração pode ser alcançada por alguma alteração da topografia ou

rugosidade do implante (KLOKKEVOLD et al., 1997) que otimizam respectivamente biomecânica e adesão celular.

As superfícies rugosas são produzidas a partir de processos de subtração incluindo o condicionamento ácido de superfície, jateamento, o mecanismo de promoção da rugosidade superficial produzido por laser e a aplicação de revestimentos de hidroxiapatita (SCHWARTZ & BOYAN, 1994; SPIEKERMANN et al., 2000).

Raslan e colaboradores (2012) desenvolveram uma técnica alternativa de enriquecimento do titânio utilizando um equipamento de usinagem por descargas elétricas. O fluido dielétrico normalmente empregado é substituído por soluções aquosas enriquecidas com fósforo, cálcio ou ambos. Dois eletrodos, um eletrodo ferramenta, confeccionado em cobre ou grafita, e o outro eletrodo é a peça, Ti_6Al_4V . Ao passar corrente elétrica nos eletrodos submersos no fluido, gera-se um canal de plasma que, após a sua dissipação, eleva a temperatura para valores superiores a $15.000^{\circ}C$. Os íons Ca^{+} , P^{+} , H^{+} alojados no canal de plasma são inseridos na superfície da liga Ti_6Al_4V . Também ocorre um processo de solidificação, favorecendo a formação de rutilo (TiO_2), perovskita (CaO_3Ti) ou hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)$). Elementos químicos do eletrodo, como carbono ou cobre, são também transferidos para a peça (Santos et al., 2016).

Essa proposta de modificação superficial baseia-se na capacidade desta superfície enriquecida quimicamente de favorecer os processos iniciais de cicatrização e interação entre as células, pois quando em contato com o sangue ocorre a formação de uma camada glicoprotéica de 2-5 nm de espessura, contendo macromoléculas (fibronectina, laminina, epibolina, epinectina, osteopontina, colágeno e vitronectina) capazes de promover a aderência celular. Estas vão promover a liberação de citocinas e fatores de crescimento, tais como, interferon -gama, TNF-alfa, RUNX-2, Osteocalcina BMP-2, sialoproteína óssea, que modulam a atividade celular circunjacente determinando a eventual taxa de aposição óssea. Ainda, uma superfície ideal visa suscitar o perfeito controle de adsorção proteica e adesão celular, assim como propiciar condições ideais para o crescimento, diferenciação e síntese proteica celular subsequente (Wennerberg et al., 1998; Annunziata & Guida, 2015).

Essa técnica de enriquecimento foi recentemente desenvolvida e patenteada, dessa maneira, o objetivo deste estudo foi analisar os aspectos biológicos por meio de testes *in vitro* em relação à biocompatibilidade desse material e células ósseas para avaliar a capacidade dessa tecnologia em favorecer a osseointegração.

2. JUSTIFICATIVA

2.1 Justificativa da Iniciação

Este presente estudo contribuiu para integrar as atividades de pesquisa com o ensino e propiciou a troca de experiências entre professores das diversas áreas envolvidas, ressaltando o caráter interdisciplinar do projeto. Dessa maneira, introduziu o acadêmico de Odontologia no meio de pesquisa, possibilitando o acesso a novos conhecimentos de forma crítica e inovadora, ampliou os conhecimentos técnicos, promovendo uma formação profissional de qualidade, bem como propiciou para uma boa atuação clínica futura. Além disso, o estudo representou a importância da pesquisa aplicada para desenvolvimento de novos materiais, gerando produtos com impacto econômicos e repercussão social.

Adicionalmente a bolsa de auxílio à pesquisa oferecida proporcionou a participação em congressos, seminários, jornadas acadêmicas contribuindo para expandir o conhecimento na área de pesquisa e também gerou produção científica.

2.2 Justificativa do Trabalho

A busca por materiais que apresentem biocompatibilidade entre células ósseas e liga metálicas é cada vez maior, na implantodontia, os implantes dentários endo-ósseos têm sido utilizados, com notório sucesso, há mais de 25 anos, sendo que o titânio (Ti) é o material mais utilizado para esse fim. (HANSSON et al., 1983).

Na tentativa de melhorar a osseointegração numerosas modificações de superfície têm sido propostas, neste sentido, a técnica de modificação superficial de enriquecimento do titânio por descargas elétrica, desenvolvida por Raslan e colaboradores (2012), foi recentemente desenvolvida e patenteada. Para a implementação dessa tecnologia no campo da implantodontia, é necessário realizar testes *in-vitro* e *in vivo* para avaliação da biocompatibilidade com células ósseas, como também do potencial osseoindutor desse material.

3. OBJETIVOS

- ✓ Análise do crescimento, proliferação celular de osteoblastos in vitro sobre as diversas superfícies de discos de titânio tratados por EDM.
- ✓ Avaliação da viabilidade celular das culturas em relação as variações de superfície dos diversos grupos de discos de titânio tratados por EDM.
- ✓ Dosagem de proteína total e de fosfatase alcalina, para avaliação dos níveis de fatores de crescimento ósseos e da atividade da enzima, respectivamente, para análise do potencial de formação óssea.
- ✓ Detecção de acúmulos de cálcio para análise da formação de matriz mineralizada.

4. METODOLOGIA

4.1 Análise e caracterização dos discos de titânio

Foram utilizados 135 discos de liga titânio (Ti6Al4V) comercial puro grau IV ASTM B348 Grau V, modificados de acordo com o grupo de tratamento proposto, fornecidos e caracterizados pelo Laboratório de Tribologia e Materiais LTM / FEMEC/UFU, cortados com 4 mm de espessura e 12 mm de diâmetro.

A composição e o protocolo de tratamentos térmicos para obtenção dos discos estão descritos nas patentes BR1020120305232 e BR1320140041121.

Foram analisados 3 tipos diferentes de superfícies:

1. T1 – discos de Ti6Al4V
2. T2- Disco de Ti6Al4V usinado (Técnica de EDM)
3. T3- Disco de Ti6Al4V usinado e dopado com $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Hidroxiapatita)

Os discos de titânio foram usinados e analisados por Microscopia Eletrônica de varredura (MEV), Microscopia de Força Atômica (MFA) e Espectroscopia Fotoelétrica de Raios X (EFRX) pela equipe do Laboratório de Tribologia e Materiais LTM/FEMEC/UFU para identificar os seguintes parâmetros:

- Rugosidade da superfície: A rugosidade de superfície dos discos (R_a) foi avaliada utilizando um rugosímetro (Prazis Rug-03, Arotec, São Paulo).
- Topografia das superfícies: Foi utilizada Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para analisar a topografia das superfícies.
- Análise da composição química da superfície: Os discos de cada grupo foram submetidos à avaliação de elementos químicos presentes na superfície. Para tanto, as superfícies foram analisadas por um Espectrofotômetro Sequencial de Fluorescência de Raios X.

4.2 Cultura de osteoblastos sobre os discos de titânio

Células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1 foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm³ com 10 mL de meio de cultura α -MEM, 10% de soro fetal bovino e 2,2 mL de penicilina-estreptomicina. Durante todo o tempo de cultivo as células estiveram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada,

contendo 5% de CO₂ e os meios trocados a cada 2-3 dias. Após confluência, as células removidas dos frascos de cultura por meio de tratamento com EDTA a 1 mM e tripsina a 0,25% e contadas em câmara de Neubauer. Em seguida, centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm, contadas e plaqueadas sobre os discos de titânio, na densidade de $3,5 \times 10^4$ células/poço, em placas de poliestireno de 24 poços e cultivadas em meio osteogênico por períodos de 7, 14 e 21 dias. O meio de crescimento foi trocado três vezes por semana e a progressão da cultura, avaliada por microscopia de fase.

Foram avaliados os parâmetros: viabilidade celular, medida da atividade de ALP (normalizada pela proteína total) e da Fosfatase Alcalina e formação de matriz mineralizada.

4.3 Viabilidade celular (Ensaio de MTT)

As culturas celulares foram testadas quanto à viabilidade celular utilizando o ensaio MTT. Este ensaio avaliou a capacidade de células metabolicamente ativas de reduzirem o MTT, convertendo os sais amarelos de tetrazolium (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol brometo) em cristais de formazan, de cor púrpura e, portanto, na capacidade que têm as células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol brometo) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazan. Para isso, nos períodos de 7, 14 e 21 dias, o sobrenadante de cada poço foi removido, adicionado 10 µl da solução de MTT e posteriormente adicionados 100 µl de DMSO à temperatura ambiente. Após a solubilização dos cristais, a quantificação foi realizada em leitor de microplacas ELX800 a 590 nm e os resultados da densidade óptica obtidos e expressos em triplicata.

4.4 Dosagem de proteína total

O conteúdo de proteína total após 7, 14 e 21 dias em cultura, foi calculado de acordo com o método de Lowry modificado. O meio de cultura será removido e congelado para dosagem dos fatores de crescimento por quimioluminescência. Os poços de cultura foram lavados três vezes em tampão fosfato 0.1M a 37°C e adicionados 2ml de lauryl sulfato de sódio 0,1%. Após 30 minutos, 1 ml desta solução foi recolhida de cada poço e misturado com 1ml de solução de Lowry,

permanecendo 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida adicionados 0,5ml de solução de fenol reagente de Folin e Ciocalteau. Este permaneceu por 30 minutos à temperatura ambiente para permitir o desenvolvimento de cor e medida de absorbância através de espectrofotômetro no comprimento de onda de 660nm.

4.5 Dosagem de fosfatase alcalina (ALP)

Ensaio para visualização da atividade de fosfatase alcalina *in situ*. O meio de cultura foi removido nos períodos de 7, 14 e 21 dias, e os poços lavados com solução de Hanks a 9,8 g/L e NaHCO₃ a 350 mg/L, aquecida a 37 °C. Cada poço incubado com 1 mL de solução tampão Tris a 120 mM, pH 8,4 contendo Fast red 1,8 mM, naftol-ASMX-fosfato a 0,9 mM e dimetilformamida 1:9. As imagens macroscópicas das culturas foram obtidas digitalmente com câmera fotográfica de alta resolução.

4.6 Teste Vermelho de Alizarina (Detecção de acúmulos de cálcio)

Em 7, 14 e 21 dias, as culturas da linhagem celular MC3T3-E1 crescidas sobre os discos dos diferentes grupos foram lavadas em solução de Hanks, fixadas em álcool etílico a 70% e coradas com vermelho de Alizarina a 2%, pH 4,2.

4.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o Programa GraphPad Prisma – Versão 5.0. Após verificação da distribuição normal, foi utilizado o teste anova 1 way. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Cultura celular

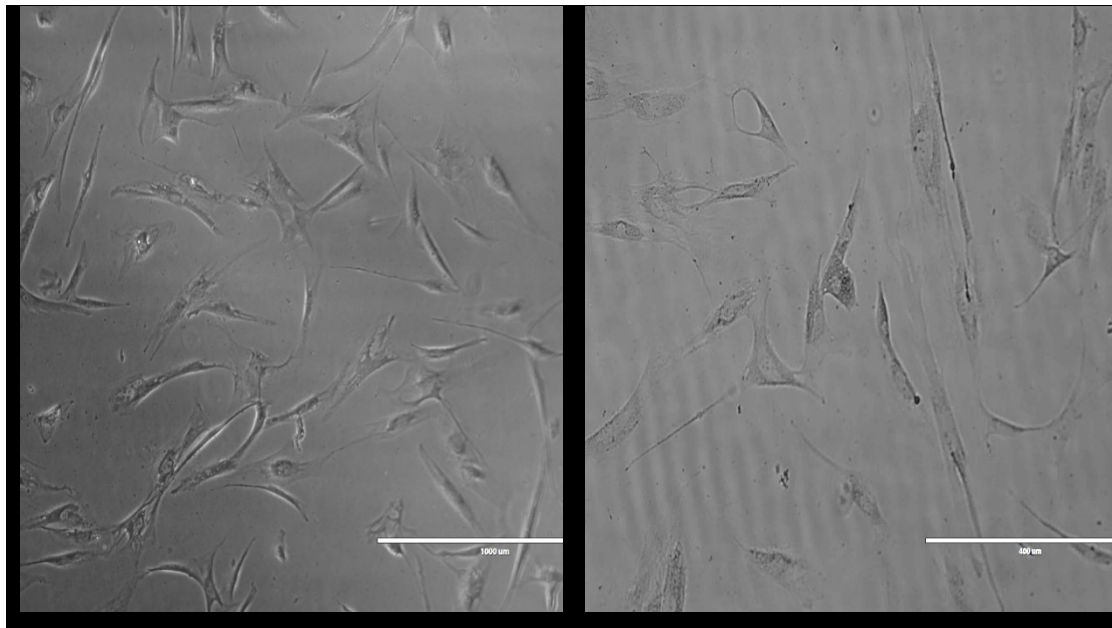


Figura 1: Cultura celular (MC3T3) observada em microscopia, em fase de pré-osteoblástica, em proliferação.

5.2 Viabilidade celular (Ensaio de MTT)

Após a solubilização dos cristais, a quantificação foi realizada em leitor de microplacas ELX800 a 590 nm e os resultados da densidade óptica foram obtidos e expressos em triplicata Controle Ti 1,2,3 (Grupo T1) EDM 1, 2, 3 (Grupo T2); HA 1, 2,3 (Grupo T3).

MTT 7 dias

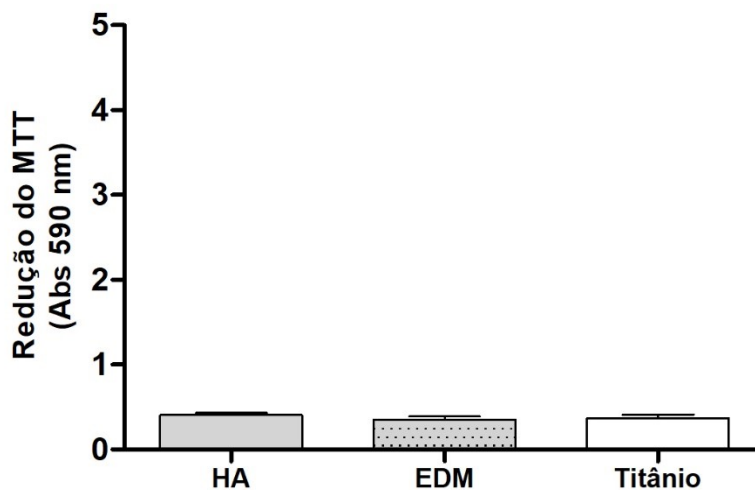


Figura 2: Teste de citotoxicidade no período de 7 dias

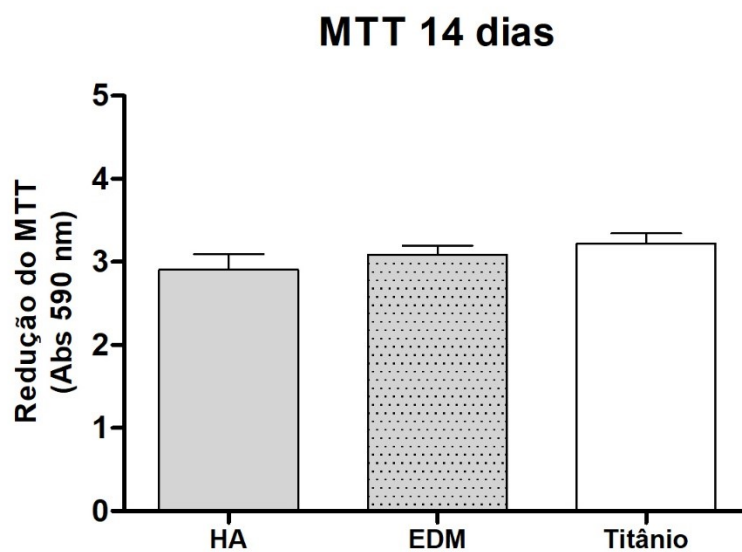


Figura 3: Teste de citotoxicidade no período de 14 dias

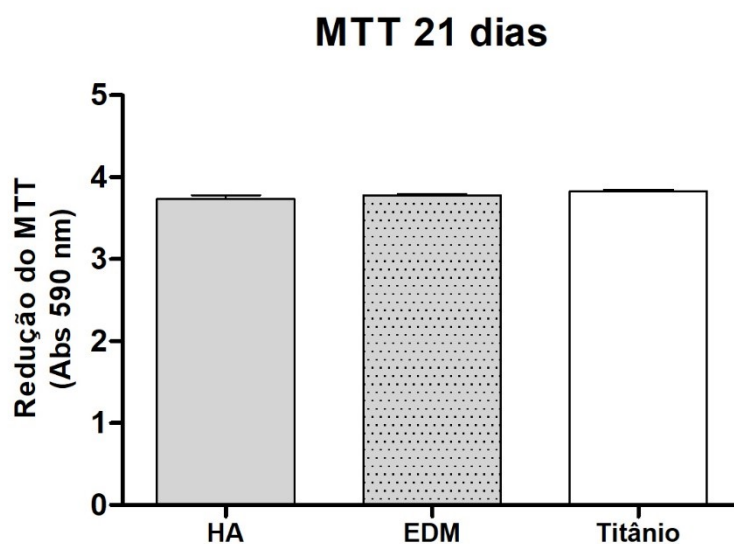


Figura 4: Teste de citotoxicidade no período de 21 dias

Nos períodos de 7, 14 e 21 dias, os grupos com T1, T2 e T3 apresentaram taxas próximas de metabolização do MTT. É possível concluir que as superfícies não apresentaram citotoxicidade *in vitro*, uma vez que as células se mostraram viáveis e metabolicamente ativas.

5.3 Dosagem de proteína total

Análise em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 660nm, para obter as medidas de absorvância expressas em triplicatas: Controle Ti 1,2,3 (Grupo T1) EDM 1, 2, 3 (Grupo T2); HA 1, 2,3 (Grupo T3).

Proteína Total 7 dias

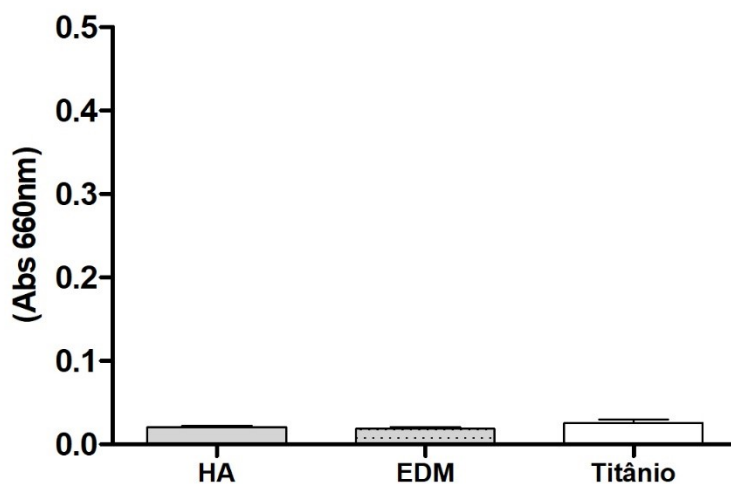


Figura 5: Dosagem de proteína total no período de 7 dias.

Proteína Total 14 dias

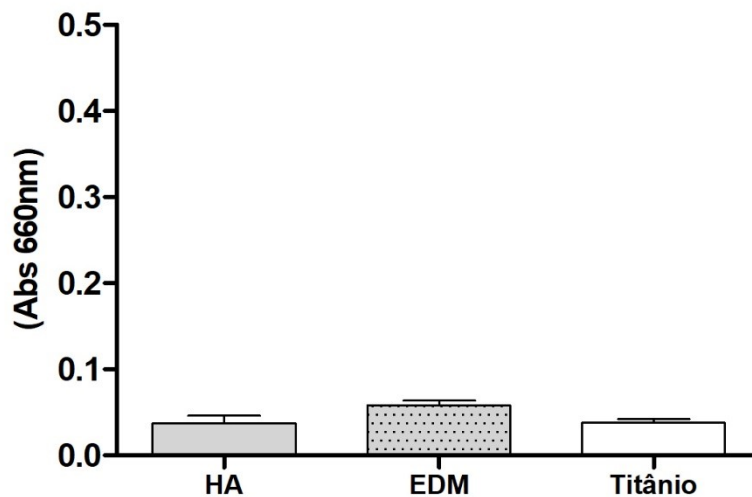


Figura 6: Dosagem de proteína total no período de 14 dias.

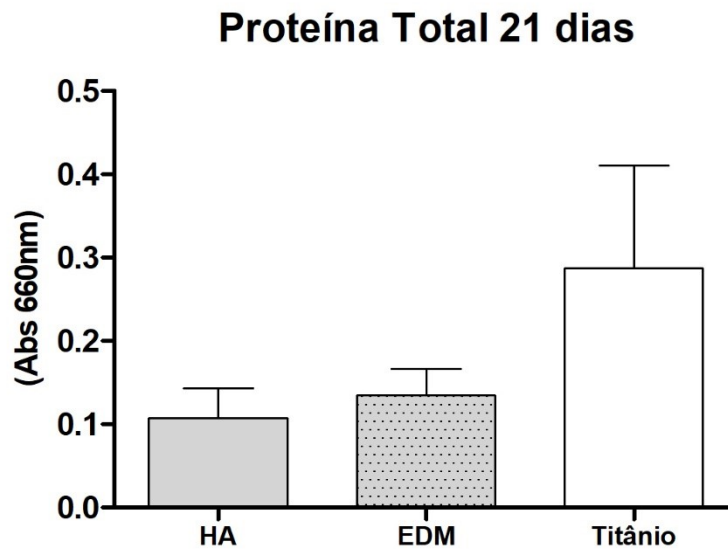


Figura 7: Dosagem de proteína total no período de 21 dias.

Nos períodos de 7 e 14 dias os grupos com T1, T2 e T3 apresentaram produção semelhante de proteína total. Já com 21 dias o grupo T1 foi o de maior valor seguido de T2 e, em seguida T3, porém, essa diferença ainda não foi significativa.

5.4 Dosagem de fosfatase alcalina (ALP)

Análise em espectrofotômetro à 590nm, para medir a absorbância expressas em triplicatas: Controle Ti 1,2,3 (Grupo T1) EDM 1, 2, 3 (Grupo T2); HA 1, 2,3 (Grupo T3).

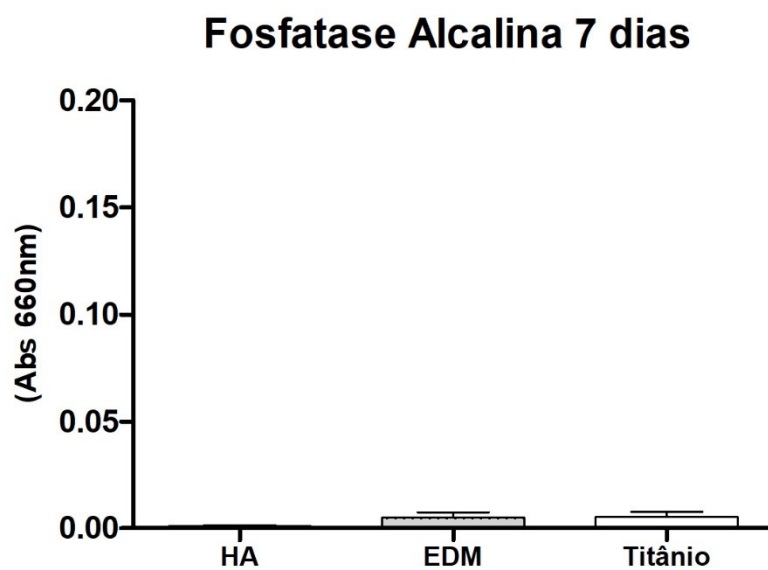


Figura 8: Quantificação do teste de Fosfatase alcalina no período de 7 dias

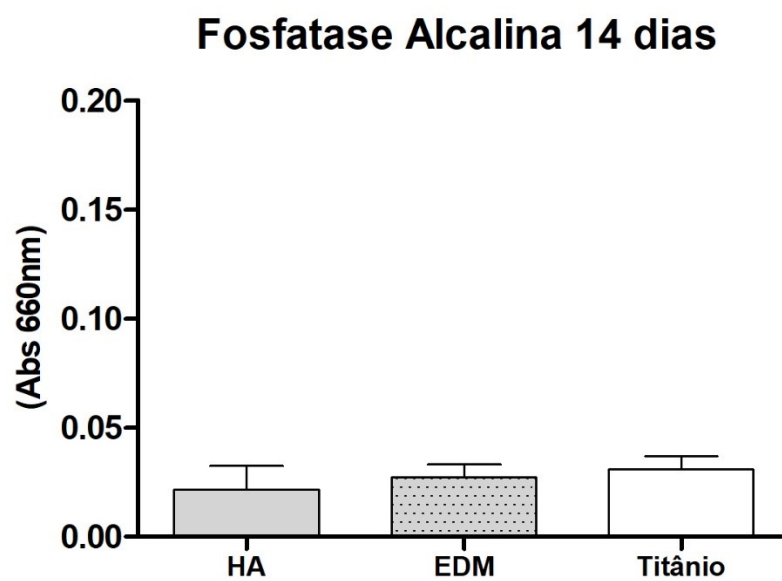


Figura 9: Quantificação do teste de Fosfatase alcalina no período de 14 dias

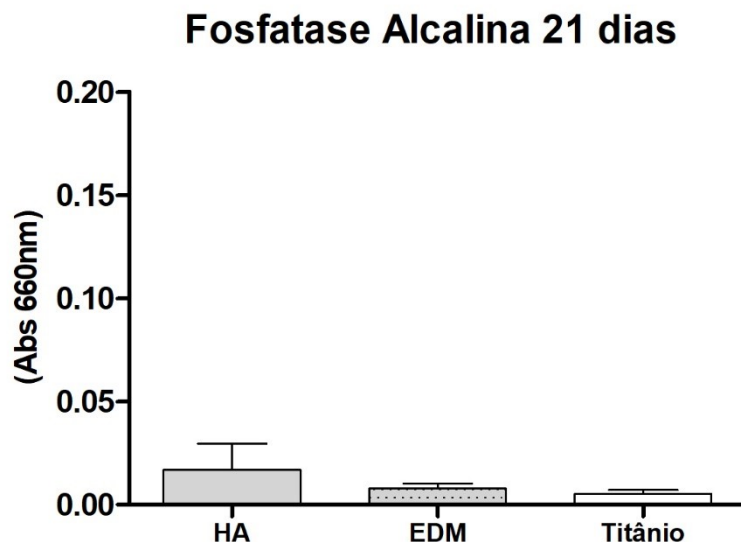


Figura 10: Quantificação do teste de Fosfatase alcalina no período de 21 dias

Nos períodos de 7 e 14 dias os grupos com T1, T2 e T3 apresentaram atividade semelhante de fosfatase alcalina. Já com 21 dias o grupo T3 foi o de maior valor seguido de T2 e, em seguida T1, porém, essa diferença não foi significativa.

5.5 Teste Vermelho de Alizarina (Detecção de acúmulos de cálcio)

As imagens do teste de vermelho de Alizarina foram obtidas digitalmente com câmera fotográfica de alta resolução, utilizando o programa DM data 200 e Microscópio de medição Mitutoyo TM AxioCam Erc5s ligado a um computador.

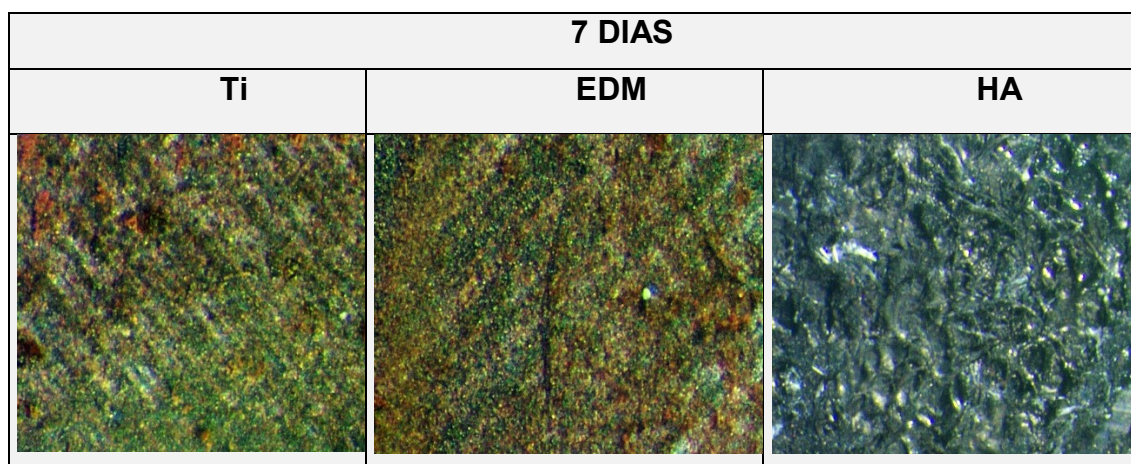


Figura 11: Imagens de superfícies das diferentes superfícies de titânio após testes de Vermelho de Alizarina, no período de 7 dias.

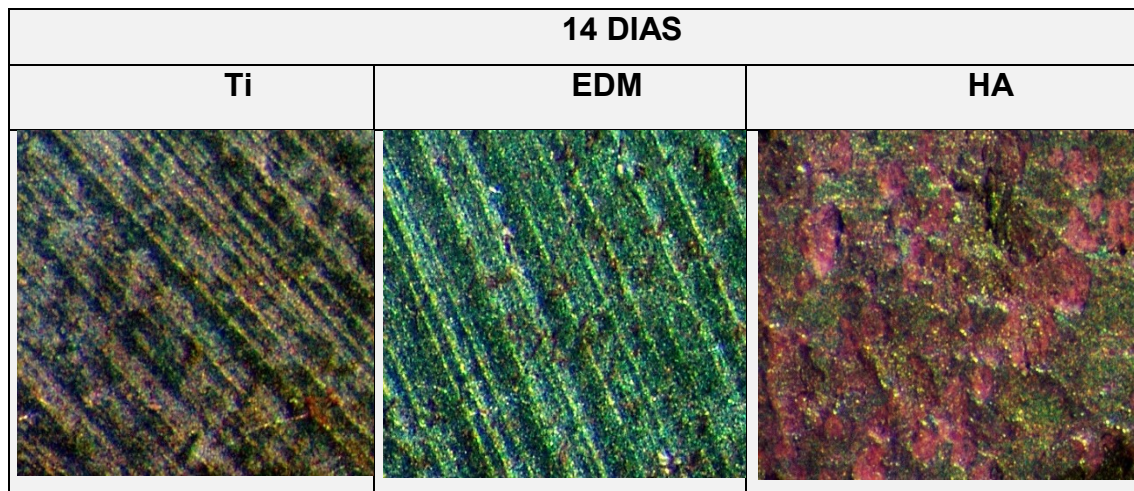


Figura 12: Teste Vermelho de Alizarina, 14 dias

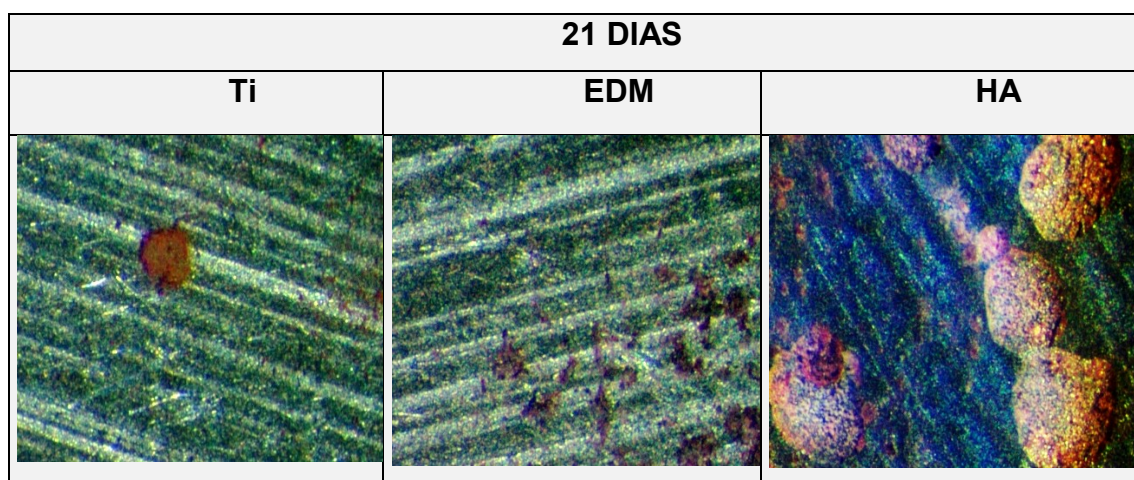


Figura 13: Teste Vermelho de Alizarina, 21 dias

A formação de matriz mineralizada pelos osteoblastos foi maior no grupo T3, discos com superfícies dopadas com Hidroxiapatita, uma vez que houve maior deposição de cálcio, marcado em vermelho, nessa superfície. Enquanto nos grupos T1 e T2 essa deposição foi pouco relevante.

6. DISCUSSÃO

Implantes metálicos endo-ósseos têm se tornado uma alternativa muito importante para a Implantodontia, sendo que a otimização das propriedades da interface osso/implante continua sendo um problema em aberto (GIAVARESI, G.; et al., 2004). Um dos maiores e mais recentes avanços foi o condicionamento das superfícies, segundo diferentes técnicas, modificando a sua microestrutura (COCHRAN D. A., 1999; ALBREKTSSON T, WENNERBERG A., 2004; GEURS N., 2002).

Há vários trabalhos, *in vitro* e *in vivo*, que atestam um crescimento mais favorável de células osteoblásticas e a correspondente formação de osso, quando em contato com superfícies que apresentam rugosidade moderada ou usinadas comparativamente com superfícies lisas ou extremamente rugosas (CAPILLA M, OLID M, OLMEDO M 2007; COOPER L, 1999; AYBAR B., 2009)

Com este trabalho foi possível verificar que as diferentes superfícies avaliadas (T1, T2 e T3) proporcionam condições favoráveis para o crescimento celular e proliferação, sendo assim biocompatíveis.

Também foi observado que implantes com a mesma macroestrutura, mas com tratamentos de superfície distintos, como é o caso dos grupos estudados, apresentaram poucas diferenças nos parâmetros avaliados. Embora a literatura afirme que as modificações de superfície geram diferenças nesses parâmetros como relatado por Schneider et al., isso não foi observado em nosso estudo.

Diferentes autores têm demonstrado que os níveis de osseointegração estão relacionados com o grau de rugosidade de superfície. O aumento da rugosidade superficial favorece a interação mecânica entre as macromoléculas da superfície do implante e o osso, o que resulta em um aumento na resistência à compressão, tensão e cisalhamento. A rugosidade superficial, correlacionada a uma alta energia de superfície, também estimula uma osseointegração mais rápida e forte pelo fato de as biomoléculas teciduais se adaptarem mais firmemente à superfície do implante (SAKAKURA., 2003). Em nosso estudo, a identificação de cristais de cálcio foi mais frequente no grupo T3 (Hidroxiapatita), indicando influência de sua rugosidade e composição neste parâmetro.

Susuki et al. (1997) avaliaram a atividade de remodelamento ósseo em implantes de titânio com diferentes rugosidades de superfície. A análise

histomorfométrica mostrou que o volume ósseo e o contato direto osso-implante foi maior para os rugosos que para os usinados após 42 semanas de implantação do teste de Vermelho de Alizarina, uma vez que o grupo com hidroxiapatita, que apresenta uma microestrutura da superfície com maior rugosidade, apresentou maior taxa de deposição de matriz mineralizada.

Com relação a proliferação celular, alguns estudos encontrados na literatura mostraram que superfícies usinadas favorecem a proliferação celular (MARTIN et al). Outros trabalhos observaram maior proliferação celular e superfícies submetidas a tratamento para promover rugosidades (DELIGIANNI, 2001; GUIZZARDI et al., 2004; ROUAHI et al., 2006), enquanto outros autores concluíram que não poderiam afirmar claramente o efeito da rugosidade de superfície em relação a proliferação celular (CASTELLANI et al., 1999).

7. CONCLUSÃO

As diferentes superfícies avaliadas proporcionam condições favoráveis para o crescimento celular e proliferação. Entretanto, não houve diferença da produção de proteína total e fosfatase alcalina, entre as superfícies avaliadas. Sendo que a superfície T3 (hidroxiapatita) apresentou maior taxa de deposição de cálcio, o que é favorável à osseointegração.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DAVIES JE. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials*, 2007; 28: 5058–5067
2. BRANEMARK PI, ADELL R, BREINE U, HANSSON BO, LINSTROM J, OHLSSON A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses in experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*, 1969; 3(2):81-100.
3. LAUSMAA, J. Surface spectroscopic characterization of titanium implants materials. *Journal of electron Spectroscopy and Related Phenomena*, v.18, p. 343-361, 1996.
4. BRACERAS, I., et al. Bone cell adhesion on ion implanted titanium alloys. *Surface & Coatings Technology*, v.1996, p. 321-6, 2005.
5. HANSSON HA, ALBREKTSSON T, BRANEMARK PI. Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants. *J Prosthet Dent*, 1983, Jul, 50(1);108-113.
6. AMARANTE ES, LIMA LA. Otimização das superfícies dos implantes: plasma de titânio e jateamento com areia condicionado por ácido – estado atual. *Pesqui Odontol Bras*, v. 15, n. 2, p. 166-173, abr./jun. 2001.
7. MASSARO C, ROTOLO P, RICCARDIS FD, MILELLA E, NAPOLI A, WIELAND M, et al. Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium implants Part I: Chemical composition. *J Mat Sci Mat Med*. 2002;13:535–48
8. SADER MS, BALDUINO A, SOARES A, BOROJEVIC R. Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16:667–75
9. KLOKKEVOLD PR, NISHIMURA RD, ADACHI M, CAPUTO A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res*. 1997 Dec;8(6):442-7.
10. SPIEKERMANN H. Atlas colorido de odontologia: Implantodontia. Porto Alegre: ed. Artmed, 2000
11. SCHWARTZ Z, BOYAN BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem*. 1994 Nov; 56(3):340-7.

12. RASLAN AA, SANTOS RF, SILVA ER. Método de Nitretação Através da Usinagem por Descargas Elétricas NDE. 2012, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020120305232, data de depósito: 12/12/2012, título: "Método de Nitretação Através da Usinagem por Descargas Elétricas NDE", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Instituição(ões) financiadora(s): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Universidade Federal de Uberlândia (UFU).
13. SANTOS RF; SILVA ER; SALES WF; RASLAN AA. Analysis of the surface integrity when nitriding AISI 4140 steel by the sink electrical discharge machining (EDM) process, *Procedia CIRP*, 2016. doi: 10.1016/j.procir.2016.01.197.
14. WENNERBERG, A.; HALLGREN, C.; JOHANSSON, C. et al. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Implant Res*, v. 9, n. 1, p. 11-19, 1998.
15. ANNUNZIATA M, GUIDA L. The Effect of Titanium Surface Modifications on Dental Implant Osseointegration. *Front Oral Biol*. 2015; 17:62-77.
16. GIAVARESI, G.; et al. Histomorphometric, ultrastructural and microhardness evaluation of the osseointegration of a nanostructured titanium oxide coating by metal-organic chemical vapour deposition: an in vivo study. *Biomaterials*, v.25, n.25, p.5583-5591, 2004.
17. COCHRAN D. A comparison of endosseous dental implant surfaces. *J Periodontol*. 1999;70:1523–39.
18. ALBREKTSSON T, WENNERBERG A. Oral implant surfaces: Part 1 - Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and In vivo responses to them. *Int J Prosthodont*. 2004;17:536–43.
19. GEURS N, JEFFCOAT R, MCGLUMPHY E, REDDY M, JEFFCOAT M. Influence of implant geometry and surface characteristics on progressive osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17:811–5.
20. TABORELLI M, JOBIN M, FRANCOIS P, VAUDAUX P, TONETTI M, SZMUKLER-MONCLER S, et al. Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (I) Surface characterization. *Clin Oral Impl Res*. 1997;8:208–16.

21. CAPILLA M, OLID M, OLMEDO M. Cylindrical dental implants with hydroxyapatite- and titanium plasma spray-Coated surfaces: 5-year results. *J Oral Implantol*. 2007;33:59–68
22. COOPER L, MASUDA T, WHITSON W, YLIHEIKKILÄ P, FELTON D. Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14:37–47.
23. AYBAR B, EMES Y, ATALAY B, TANRIKULU S, KAYA AS, ISSEVER H, et al. The influence of titanium surfaces in cultures of neonatal rat calvarial osteoblast-like cells: An immunohistochemical study. *Implant Dent*. 2009 Feb;18:75–85.
24. SAKAKURA CE, MARGONAR R, HOLZHAUSEN M, NOCITI FH JR., ALBA RC JR., MARCANTONIO E JR. Influence of cyclosporin A therapy on bone healing around titanium implants: a histometric and biomechanic study in rabbits. *J Periodontol*. 2003;74:976-81.
25. SUZUKI K, AOKI K, OHYA K. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rabbits. *Bone*. 1997 Dec;21(6):507-14.
26. MARTIN JY, SCHWARTZ Z, HUMMERT TW et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J biomed Mater Res* 1995 Mar; 29(3): 389-401
27. DELIGIANNI DD, KATSALA N, LADAS S et al. Effect of roughness of titanium alloy Ti – AL6 -V4 on human bone marrow cells response and protein adsorption. *Biomaterials* 2001; 22 (11): 1251-1260
28. GUIZZARDI S, GALLI C, MARTINI D, BELLETTI S, TINTI A, RASPANTI M, et al. Different titanium surface treatment influences human mandibular osteoblast response. *J Periodontol*. 2004; 75:273–82
29. ROUAHI M, CHAMPION E, HARDOUIN P et al. Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials. *Biomaterials* 2006 May; 27 (14): 2829-44
30. CASTELLANI R, RUIJTER A, RENGGLI H et al. Response of rat bone marrow cells to differently roughened titanium discs. *Clin Oral Implants Res* 1999 OCT; 10(5): 369-78