

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUPERFÍCIES NA ADESÃO E
PROLIFERAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS**

MAGÁLI BECK GUIMARÃES

2010

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

MAGÁLI BECK GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUPERFÍCIES NA ADESÃO E
PROLIFERAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS**

Porto Alegre

2010

MAGÁLI BECK GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUPERFÍCIES ADESÃO E
PROLIFERAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Prótese Dentária, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciana Mayumi Hirakata

Co-orientador: Prof Dr Roberto Hübler

Porto Alegre

2010

DEDICATÓRIA

Aos meus pais.
Pelo amor, pelo apoio e pela paciência incondicional.
Quanto mais o tempo passa, mais me orgulho de continuar
aprendendo com o exemplo de vocês.
Vocês serão meus eternos mestres da vida.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A **Profa. Dra. Luciana Mayumi Hirakata**, pela orientação desta pesquisa e de toda trajetória no mestrado. Você me ensinou, principalmente, que hierarquia não quer dizer autoritarismo, que profissionalismo não significa frieza e que se doar ao trabalho não significa abdicar de todos os outros afazeres da vida. Sua delicadeza e tranqüilidade na condução dessa orientação e na convivência durante esse período servirão de inspiração em minha vida.

A Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Prótese Dentária da Faculdade de Odontologia da PUCRS em nome do **Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira**, agradeço a oportunidade proporcionada ao me confiar uma vaga no curso de mestrado e o conhecimento adquirido durante o mesmo. Esse período marcou decisivamente meu crescimento profissional.

Ao **Laboratório de Materiais e Nanociências do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Física da Faculdade de Física da PUCRS**, mais precisamente ao **Grupo de Estudos de Propriedades de Superfícies e Interfaces (GEPsi)**, pela oportunidade de realização da texturização de superfície e das análises físico-químicas da amostra estudada.

Em especial, ao **Prof. Dr. Roberto Hübler** pela dedicação, disponibilidade e pelo acolhimento em todos os momentos nos quais precisei de sua orientação. Meu muito obrigado. Sem sua presença não teria a tranqüilidade necessária na condução desse experimento. É um professor admirável, competente e humano. Com certeza, um exemplo profissional a seguir.

Ao **Sr. André Vargas**, pela ajuda na elaboração das análises de superfície e pela presença sempre de grande contribuição nas infundáveis discussões científicas sobre o assunto.

Ao **Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS**, na pessoa da **Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado**, pela oportunidade de execução da cultura celular deste experimento.

Ao **Centro de Microscopia e Microanálise da PUCRS**, na pessoa da **Prof^a Berenice Anina Dedavid**, pela oportunidade e auxílio na análise das amostras.

Ao **Sr. Roberto Christi**, pelo auxílio nos cálculos farmacológicos relacionados à elaboração e ajuste da concentração da solução de pamidronato dissódico. A disponibilidade e boa vontade em ajudar o próximo é exemplar em sua pessoa.

A **CAPES**, por viabilizar a realização do Curso de Mestrado em Prótese Dentária.

Ao **Corpo Docente** do Programa de Pós-Graduação em Prótese Dentária, nível Mestrado, da PUCRS. Agradeço os ensinamentos técnico-científicos de tão alta qualidade recebidos, reflexo da qualidade profissional que o caracteriza.

Aos **funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da PUCRS**, pela presteza e educação sempre presentes no convívio diário.

Aos meus colegas de Pós-Graduação em Prótese Dentária, nível Mestrado, da PUCRS, **Marina Rechden Lobato, Daniela Disconzi Seitenfus, Renata Sesti Diefenbach, Leonardo Hoffmann Barcellos, Fabrício Dorigon da Silva, Maria Fernanda Nascimento e Sabrina Santafé**. Obrigado pela convivência, companherismo e pelos inúmeros bons momentos que passamos juntos. Todos vocês serão lembrados com carinho.

Um especialíssimo agradecimento aos colegas **Maria Fernanda e Fabrício**. A amizade desenvolvida entre nós, fortalecida pelo envolvimento muito além do curso, foi de grande valor e inestimável importância em minha vida. Preservarei esse laço afetivo para sempre se me permitirem.

Aos meus irmãos, **Micéli e Diego Blaya**. Sei, mais do que nunca, que tenho em vocês, independente de qualquer circunstância, um ponto de apoio e compreensão, um lugar de trocas e crescimento, um abrigo para as incertezas da vida e o carinho sincero que conforta meu coração. Obrigada pelos conselhos, pela troca de idéias, pelo acolhimento e pela confiança.

Ao meu amor, **Rodrigo**. Obrigada por fazer aflorar o que tenho de melhor e por permanecer ao meu lado mesmo no que tenho de pior. Enquanto nos sobrar amor, que venham as adversidades. E frente às adversidades, que cresça e se fortaleça nosso amor.

A **Deus**, por me permitir enxergar muito além daquilo que se postava em minha frente, por me dar forças quando eu julgava não mais as ter, por me proporcionar nascer em uma família digna e de bons princípios, pela saúde, pelos amigos e por, através dos obstáculos, mostrar-me a força, o potencial e a fé existentes em mim.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

*“Semeie em ato e você colhe um hábito.
Semeie um hábito e você colhe um caráter.
Semeie um caráter e você colhe um destino.”*
Charles Reade

RESUMO

RESUMO

Atualmente, o foco de muitas pesquisas científicas em Implantodontia está voltado para a modificação da superfície do titânio na busca de alternativas que proporcionem maior rapidez e qualidade no processo de osseointegração. A osseointegração é um fenômeno que acontece fundamentalmente através da resposta interfacial das células ósseas em contato com a superfície do titânio. Diferentes métodos de tratamento podem ser utilizados para modificar as propriedades topográficas e químicas da superfície do titânio a fim de otimizar as reações tecido-implante. Neste estudo foi avaliada a influência de diferentes tratamentos de superfície do titânio na adesão e proliferação de osteoblastos humanos, através da análise quantitativa do número de células aderidas em diferentes períodos de cultura celular. Para isso, 40 discos de titânio grau II, comercialmente puro, de 15mm de diâmetro e 1mm de espessura, foram divididos em quatro grupos conforme a caracterização de sua superfície: G1. maquinada; G2. ácido-condicionada; G3. com cobertura de hidroxiapatita; e G4. com bisfosfonato imobilizado na cobertura de hidroxiapatita. Células osteoblásticas derivadas de osteossarcoma humano (SaOS-2) foram cultivadas sobre os discos e a contagem celular foi realizada em 3, 7 e 14 dias. Para determinação do número de células, um processo de coloração dos núcleos com Iodeto de Propídio foi realizado, e os discos foram analisados em microscópio óptico sob luz ultravioleta. As contagens celulares nos diferentes grupos experimentais e períodos de cultura foram comparadas por meio de ANOVA, complementado pelo teste de Tukey. Os resultados da análise estatística permitem concluir que: (1) a superfície do titânio e o período de cultura celular, bem como a interação de ambos, significativamente afetam o crescimento celular; (2) a modificação na superfície do titânio através de condicionamento ácido favorece, *in vitro*, a adesão e proliferação de osteoblastos humanos. Mais pesquisas são necessárias para elucidar a influência do bisfosfonato imobilizado na superfície do titânio nos eventos iniciais da osteogênese.

Palavras-chave: Osseointegração. Osteoblastos. Adesão de células. Proliferação de células.

ABSTRACT

ABSTRACT

Nowadays, the focus of many researches in Implant Dentistry is on the modification of the titanium surface in search of alternatives that can provide more quickness and quality to the osseointegration process. Osseointegration is a phenomenon that happens mainly through the interfacial response of bone cells in contact with the titanium surface. There are different treatment methods that can be used to modify the topographic and chemical properties of the titanium surface in order to optimize the tissue-implant reactions. In this study, we evaluated the influence of different titanium surface treatments in the adhesion and proliferation of human osteoblasts by quantitatively analyzing the number of adherent cells in different cell culture periods. Forty level II titanium disks with 15mm diameter and 1mm thickness were divided into four groups according to their surface characterization: G1. machined; G2. acid-etched; G3. with hydroxyapatite coating; and G4. with bisphosphonate immobilized on hydroxyapatite coating. Osteoblast cells derived from human osteosarcoma (SaOS-2) were cultured on the disks and the cell counting was made in 3, 7 and 14 days. To determine the number of cells, a coloring process of the nucleus using propide iodide was carried out and disks were then analyzed in an optical microscope under ultraviolet light. The cell counting in the different experimental groups and culture periods was compared using ANOVA complemented by Tukey's test. Results of the statistical analysis made it possible to conclude that: (1) the titanium surface and the cell culture period, as well as the interaction of both, significantly affect the cell growth; (2) modifying the titanium surface by acid-etching favors the adhesion and proliferation of human osteoblasts, *in vitro*. Further researches are necessary to elucidate the immobilized bisphosphonate influence on the titanium surface at the initial osteogenesis events.

Key-words: Osseointegration. Osteoblasts. Cell adhesion. Cell proliferation.

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Discos de titânio: A. Diâmetro de 15 mm; B e C. Espessura de 1mm, medida através de espessímetro. 47
- Figura 2** - A. Material utilizado para cultura celular; B. Discos posicionados nos poços das placas de cultura, com a suspensão de células no meio de cultura. 53
- Figura 3** - Microscópio óptico conectado a um computador, utilizado para realização das imagens para contagem celular. 54
- Figura 4** – Desenho esquemático da divisão de cada disco da amostra em nove partes, das quais cinco (demarcadas por um “x”: 1, 3, 5, 7 e 9) eram micrografadas e utilizadas para contagem celular. 55
- Figura 5** - Representação do processo de contagem celular através de grade traçada com 14 retângulos padronizados de 2,5 x 3,25 cm. O programa utilizado foi o *Microsoft Powerpoint*® 2003. 56
- Figura 6** - Diagrama da análise de difração de raiosX das amostras: em verde, grupo que recebeu tratamento superficial com condicionamento ácido; em vermelho, grupo que recebeu cobertura com hidroxiapatita; em azul, grupo que foi imerso em solução de pamidronato dissódico. 60
- Figura 7** - Imagens de MEV - A. Superfície do titânio maquinada; B. Superfície de titânio tratada com condicionamento ácido; C. Titânio com densa cobertura de hidroxiapatita; D. Superfície da amostra que foi imersa em pamidronato dissódico. 62
- Figura 8** - Imagens de microscopia óptica em 50X de aumento da proliferação celular em 3 dias de cultura nos diferentes grupos: A. Titânio maquinado; B. Titânio ácido-condicionado; C. Titânio coberto com hidroxiapatita; D. Titânio com cobertura de hidroxiapatita que foi imerso em pamidronato dissódico. 68
- Figura 9** - Imagens de microscopia óptica em 50X de aumento da proliferação celular em 7 dias de cultura nos diferentes grupos: A. Grupo 1; B. Grupo 2; C. Grupo 3; D. Grupo 4. 69
- Figura 10** - Imagens de microscopia óptica em 50X de aumento da proliferação celular em 14 dias de cultura nos diferentes grupos: A. Grupo 1; B. Grupo 2; C. Grupo 3; D. Grupo 4. 70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Contagem de células nos diferentes períodos de cultura em todos os grupos estudados. 65

Gráfico 2 - Relação entre rugosidade superficial média e crescimento celular nos períodos de cultura experimentais. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Disposição dos grupos de estudo.	47
Tabela 2 - Composição química superficial por análise de XRF (%).	59
Tabela 3 - Valores médios de rugosidade superficial da amostra estudada.	61
Tabela 4 – Composição superficial por análise de EDS (%).	63
Tabela 5 - Média (desvio-padrão) de crescimento celular para cada tipo de tratamento nos diferentes tempos experimentais.	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	-	Por cento
°C	-	Graus Celsius
®	-	Marca registrada
Θ	-	Teta
µg	-	Micrograma
µl	-	Microlitro
µm	-	Micrometro
ANOVA	-	<i>Analysis of Variance</i> – Análise de Variância
ATP	-	Adenosina Trifosfato
BF	-	Grupo Bifosfonato
C	-	Carbono
CA	-	Grupo Condicionamento ácido
Ca	-	Cálcio
CaTiO ₃	-	Titanato de Cálcio
cm	-	Centímetro
CO ₂	-	Dióxido de carbono
CT	-	Grupo Controle
D-MEM	-	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
DPBS	-	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> – Solução Salina Tamponada Fosfatada de Dulbecco
EDS	-	Análise química semi-quantitativa por energia dispersiva
Fig	-	Figura
HA	-	Hidroxiapatita/ Grupo Hidroxiapatita
HF	-	Ácido Fluorídrico
HNO ₃	-	Ácido Nítrico
IBDM	-	<i>Ion Beam Dynamic Mixing</i>
LTDA	-	Limitada
M	-	Molar
MEV	-	Microscópio Eletrônico de Varredura
mg	-	Miligrama
MG63	-	Células de fenótipo osteoblástico
ml	-	Mililitro
mm	-	Milímetro
n	-	Número da amostra
N	-	Nitrogênio
Nº	-	Número
Na	-	Sódio
nm	-	Nanômetro
O	-	Oxigênio
P	-	Fósforo
PA	-	Pura
pH	-	Potencial hidrogeniônico
ppm	-	Partes por milhão

PO ₃	-	Fosfato
PUCRS	-	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Ra	-	<i>Average Roughness</i> - Rugosidade média
Rh-BMP	-	Proteína Morfogenética Óssea Recombinante Humana
SaOS-2	-	Células de fenótipo osteoblástico
SPSS	-	<i>Statistical Package for Social Sciences</i> – Pacote Estatístico para Ciências Sociais
Ti	-	Titânio
Ti cp	-	Titânio comercialmente puro
TiO	-	Óxido de titânio
TiO ₂	-	Dióxido de titânio
Ti ₂ O ₃	-	Trióxido de dititânio
U	-	Unidade
u.a.	-	Intensidade
XRD	-	Difração de RaiosX
XRF	-	Fluorescência de RaiosX

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	PROPOSIÇÃO	28
2.1	Problema	29
2.2	Hipótese nula	29
3	REVISTA DA LITERATURA	30
2.1	Superfície de titânio	31
2.2	Superfície de titânio tratada com condicionamento ácido	32
2.3	Superfície de titânio com cobertura de fosfato de cálcio	33
2.4	Bisfosfonatos	36
2.5	Imobilização de bisfosfonatos em superfície de titânio	40
2.6	Cultura celular	43
4	METODOLOGIA	46
4.1	Processamento dos discos de titânio e disposição dos grupos	47
4.2	Descrição do tratamento de superfície do titânio	48
4.2.1	Titânio maquinado	48
4.2.2	Condicionamento ácido	48
4.2.3	Aplicação da cobertura de hidroxiapatita	48
4.2.4	Imobilização de bisfosfonato	49
4.3	Análise da amostra	49
4.3.1	Análise de Fluorescência de RaiosX	50
4.3.2	Análise de Difração de RaiosX	50
4.3.3	Análise da Rugosidade Superficial	50
4.3.4	Microscopia e microanálise	51
4.4	Esterilização da amostra	51
4.5	Cultura de células osteoblásticas humanas (SaOS-2)	51
4.5.1	Meio de cultura celular	52
4.5.2	Análise celular quantitativa	53
5	RESULTADOS	57
5.1	Análise da amostra	58
5.1.1	Análise de Fluorescência de RaiosX	58
5.1.2	Análise de Difração de RaiosX	59
5.1.3	Análise da Rugosidade Superficial	60
5.1.4	Microscopia e microanálise	61
5.2	Cultura celular	63
5.2.1	Comparação entre os períodos de tempo	66
5.2.2	Comparação entre os tratamentos de superfície	67
6	DISCUSSÃO	72

7 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO 1 – Aprovação da Comissão Científica e de Ética	91

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas quatro décadas, desde os estudos fundamentais sobre osseointegração desenvolvidos pela equipe do professor Brånemark, a terapia com implantes dentários endósseos, para reabilitação de pacientes parcial ou totalmente edêntulos, tem sido amplamente pesquisada e documentada pela comunidade científica mundial (BUSER *et al*, 1998).

A partir do estabelecimento de critérios clínicos e experimentais para o alcance da osseointegração, tornou-se objetivo a busca de alternativas que proporcionem maior qualidade e rapidez nesse processo. As pesquisas na área de Implantodontia têm se direcionado para a viabilização mais rápida dos implantes dentários para estabelecimento de função, na tentativa até mesmo de eliminar o período de cicatrização óssea livre de carga funcional, como recomendado nos protocolos iniciais de Brånemark (TEIXEIRA, 2001).

Quando um implante é colocado em contato com o tecido humano para osseointegração, sua biocompatibilidade depende da resposta interfacial das células em contato com a superfície do implante (HUANG *et al*, 2004). Uma superfície considerada “ótima” facilita a adesão, proliferação e diferenciação de células formadoras de tecido ósseo, e promove a deposição de matriz colágena óssea sobre o implante (LI *et al*, 2006).

A adesão de células osteoblásticas na superfície de um implante, *in vitro*, reflete a capacidade relativa do material do qual esse implante é feito de indução de formação óssea por parte da célula e é considerada crítica para a seleção de biomateriais que poderão exibir ótima resposta celular *in vivo* (LI *et al*, 2006).

Nesse sentido, muitas pesquisas têm sido realizadas acerca das respostas celulares a diferentes processos e materiais utilizados na caracterização da superfície do titânio de implantes endósseos, a fim de acelerar o processo de osteogênese (JINNO *et al*, 2004; ZHU *et al*, 2004; PULEO e THOMAS, 2006). Diferentes métodos de tratamento podem ser utilizados para modificar as propriedades topográficas e químicas da superfície de implantes dentários, dentre eles, recobrimento com hidroxiapatita, jateamento com diversas substâncias, tratamento com plasma-*spray* de titânio, condicionamento ácido ou, ainda, uma associação dessas técnicas (RONOLD, LYNGSTADAAS e ELLINGSEN, 2003).

Pode-se notar que as possibilidades de modificação das propriedades de superfície dos implantes são enormes, tanto em relação aos aspectos químico e biológico, quanto aos aspectos morfológico e topográfico (SILVA, 2004).

Embora muito já se saiba a respeito de diferentes substâncias e técnicas utilizadas na caracterização da superfície do titânio, a superfície ideal continua desconhecida, uma vez que diversos são os fatores a serem controlados e que, em conjunto, influenciam a reação celular, tais como composição, energia de superfície, rugosidade superficial e topografia (BAXTER *et al*, 2002).

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Com o intuito de contribuir para o avanço do conhecimento em Implantodontia, a respeito dos efeitos de diferentes superfícies nos eventos iniciais de osteogênese, propõe-se a presente pesquisa, que tem como objetivos:

- a) Promover a imobilização de um agente modulador da atividade óssea (bisfosfonato) na camada de fosfato de cálcio aplicada sobre o titânio;
- b) Avaliar e comparar a capacidade das diferentes superfícies desenvolvidas nesta pesquisa (condicionamento ácido, cobertura com fosfato de cálcio e imobilização de bisfosfonato) de permitir a adesão e proliferação de células osteoblásticas humanas.

2.1 Problema

As diferentes superfícies desenvolvidas nesta pesquisa favorecem a adesão e a proliferação de células de linhagem osteoblástica (SaOS-2)?

2.2 Hipótese nula

As superfícies desenvolvidas nesse estudo não favorecem, *in vitro*, a adesão e proliferação de células da linhagem osteoblástica (SaOS-2).

3 REVISTA DA LITERATURA

3.1 Superfícies de titânio

O titânio tem sido o material de escolha para os implantes de ancoragem óssea. Trata-se de um material reativo, cujos cortes superficiais provocam a formação espontânea de uma película de óxido (de 3-5nm à temperatura ambiente) com diferentes estequiometrias (TiO , Ti_2O_3 e TiO_2) e biocompatível. Em contato com o tecido orgânico, esta película é insolúvel e não há a liberação de íons. O colágeno presente na matriz osteoide reage com as partículas de óxido, criando a interface osso-implante (MEDEIROS, 1992).

O termo interface refere-se à interação existente entre a superfície do implante e os tecidos orgânicos circundantes. O titânio apresenta uma propriedade denominada bioinércia ou passividade do metal na relação com o tecido ósseo adjacente, ao contrário de outros materiais ditos bioativos que proporcionam uma ligação tanto química quanto mecânica com o osso adjacente, ao nível de interface osso-implante. Nos materiais bioativos, em função da similaridade química com a parte mineral óssea, o tecido ósseo se liga a ele, permitindo a osteocondução por meio de recobrimento por células ósseas. Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas a base de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio (TEIXEIRA, 2001; HENCE e WILSON, 1993).

Assim, muita atenção tem sido concentrada na melhora da interação da superfície do implante de titânio com o tecido ósseo adjacente através de biomateriais e/ou técnicas de modificação de topografia, a fim de que tal superfície tenha propriedades de osteocondução

e/ou osteoindução capazes de proporcionar um aumento significativo na rapidez com que o processo de osseointegração ocorre e, conseqüentemente, diminuir o tempo necessário para a viabilização do implante em função (PULEO e THOMAS, 2006).

Estudos básicos em ciências físicas e biológicas alicerçam o desenvolvimento de implantes cirúrgicos osseointegráveis em Odontologia. Essa mesma situação ocorre em outras áreas, como tecnologia, ciência de superfícies, mecânica e biomecânica de estruturas tridimensionais, biologia e processos da cicatrização de feridas ao longo da interface com biomateriais e a descrição dos primeiros biofilmes que se desenvolvem em contato com o sangue ou líquido tissular. O deslocamento progressivo dos materiais para biomateriais tem sido extremamente importante para a aplicação biomédica dos implantes cirúrgicos de titânio (MISCH, 1993).

3.2 Superfícies de titânio tratadas com condicionamento ácido

Os processos de texturização de superfícies metálicas mais aplicados atualmente em metalurgia dividem-se em eletroquímicos, químicos e mecânicos, os dois últimos com maior utilização em Implantodontia (TEIXEIRA, 2001).

As técnicas de texturização de superfície podem transformar a superfície lisa do implante que sofreu usinagem simples em um substrato rugoso pela adição ou subtração de material. Um exemplo de texturização da superfície do titânio por subtração de material é o condicionamento ácido (MISCH, 2000).

O condicionamento ácido do titânio é realizado pela imersão em uma solução ácida que promove a corrosão de sua superfície criando depressões com formas e dimensões específicas. A composição e concentração da solução ácida, além do tempo de exposição e

da temperatura ambiente são fatores determinantes no resultado do ataque químico na microestrutura da superfície (SYKARAS *et al*, 2000).

Muitos sistemas de implantes dentários comercialmente disponíveis atualmente utilizam o condicionamento ácido do titânio como uma forma de caracterizar a superfície do implante, na busca de um processo de osseointegração mais rápido. Entretanto, ainda não há uma padronização neste processo industrial (SZMUCLER-MONCLER, TESTORI e BERNARD, 2003), nem mesmo um consenso sobre qual a medida de rugosidade superficial criada por esse processo seria mais favorável a resposta óssea (WENNERBERG e ALBREKTSSON, 2009).

Tal microestrutura da superfície pode ser quantificada utilizando-se um aparelho chamado perfilômetro, a fim de que se possa gerar um valor para comparação e busca da superfície que apresente os melhores resultados de resposta celular. Essa metodologia vem sendo utilizada em muitos estudos (SZMUCLER-MONCLER, TESTORI e BERNARD, 2004; ZHU *et al*, 2004; SILVA, 2004; SCHLIEPHAKE *et al*, 2009). Entretanto, não há padronização nas técnicas de mensuração utilizadas em todos os estudos que avaliam a topografia de superfície criada, o que resulta em dificuldades na comparação entre pesquisas e, conseqüentemente, na geração de evidências cientificamente mais concretas (WENNERBERG e ALBREKTSSON, 2009).

3.3 Superfícies de titânio com cobertura de fosfato de cálcio

Implantes de titânio com cobertura de fosfato de cálcio, incluindo a hidroxiapatita, são bem conhecidos pela boa osseocondução (o estágio primário da osteogênese), assim como pela aderência direta ao tecido ósseo *in vivo*. A expressão da fosfatase alcalina e a resposta do hormônio paratireóideo são maiores em culturas celulares desenvolvidas em

hidroxiapatita que naquelas desenvolvidas em titânio (MASSAS, PITARUI e WEINREB, 1993), e a formação *in vitro* da matriz extracelular são maiores em superfícies cobertas por fosfato de cálcio que em titânio (MARTIN *et al*, 1995). Algumas hipóteses têm sido oferecidas para explicar o efeito e o mecanismo biológico final das coberturas de fosfato de cálcio. Primeiro, o fosfato de cálcio implantado atua como um sítio de nucleação e exhibe propriedades cristalográficas na nova estrutura desenvolvida. Os íons de cálcio se dissolvem da superfície de fosfato de cálcio, resultando na deposição de uma camada mineralizada. Isso estimula as células ósseas a continuar a síntese de matriz extracelular (área de aderência) e a calcificação. Além disso, cerâmicas de fosfato de cálcio absorvem várias proteínas osseocondutivas e/ou osseointutivas, as quais têm um importante papel na mineralização do tecido ósseo (MASUDA *et al*, 1998; COOPER *et al*, 1998).

É afirmado que uma camada fina de fosfato de cálcio tem várias vantagens. Primeiro, ela previne a fratura que pode ocorrer na cerâmica quando depositada em camadas mais espessas. Segundo, a topografia da superfície não muda, o que tem efeitos marcantes no comportamento das células. Terceiro, tal cobertura habilita a imobilização de proteínas funcionais e drogas como as rh-BMPs ou bisfosfonatos (YOSHINARI *et al*, 2002).

Implantes de titânio com cobertura de plasma-*spray* de titânio e de hidroxiapatita foram avaliados e comparados. As observações demonstram que a cobertura de hidroxiapatita tende a acelerar a osseointegração. Os implantes com cobertura de hidroxiapatita exibem um decréscimo mais acelerado na micromobilidade, quando comparados com os tratados com plasma-*spray* de titânio (GEURS *et al*, 2002).

Um estudo avaliou o comportamento de células osteoblásticas em um substrato de filme de cristais de fosfato de cálcio, *in vitro*, incluindo adesão, proliferação, expressão de

genes marcadores e formação de matriz óssea mineralizada. A superfície rugosa de fosfato de cálcio apresentou um número significativamente maior de células aderidas em relação à cultura sobre discos lisos de polietileno. As mesmas aderiram mais rapidamente ao filme de fosfato de cálcio do que sobre a superfície lisa. Uma alta concentração de íons dos cristais de apatita na superfície do filme de fosfato de cálcio, possivelmente, reage com os constituintes orgânicos e formam uma interface orgânica-inorgânica que adsorvem na cerâmica, acentuando a adesão osteoblástica. Nódulos mais calcificados foram formados sobre o filme de fosfato de cálcio, em comparação às culturas sobre os discos lisos. As células cultivadas sobre o fosfato de cálcio expressam genes marcadores como a fosfatase alcalina, osteocalcina, osteonectina e osteopontina (HONG *et al*, 2003).

Foi também realizado um estudo comparativo entre duas superfícies de implantes osseointegráveis: Ti comercialmente puro e Ti revestido de hidroxiapatita. Após a implantação em tíbia de coelhos e oito semanas de período cicatricial, as amostras foram obtidas e avaliadas sob microscopia de luz ultravioleta e fluorescência. Na microscopia de luz ultravioleta, verificou-se a biocompatibilidade de ambas as superfícies, porém a avaliação histomorfométrica demonstrou uma melhor interação do tecido ósseo com a superfície de hidroxiapatita. Histologicamente, observou-se um contato direto do tecido ósseo com as amostras de hidroxiapatita, sendo que nas de Ti verificou-se a presença de um espaço entre o tecido ósseo e a superfície do implante. Os resultados demonstraram qualitativamente uma melhor integração do tecido ósseo com os implantes revestidos por hidroxiapatita, quando comparados com os de dióxido de titânio (YOSHIMOTO *et al*, 2004).

3.4 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos são compostos farmacologicamente simples, considerados análogos dos pirofosfatos por possuírem uma estrutura fósforo-carbono-fósforo, em comparação com a estrutura fósforo-oxigênio-fósforo do pirofosfato. Uma vez que o pirofosfato sofre rápida degradação enzimática no organismo, o bisfosfonato funciona como um análogo resistente a essa degradação capaz de ter a mesma função frente ao tecido ósseo: controle dos mecanismos de reabsorção óssea (FLEISCH, 1998).

O termo “bisfosfonato” é derivado de sua estrutura farmacológica, a qual possui dois grupos fosfato (PO_3) covalentes ligados a um carbono central. A estrutura P-C-P do bifosfonato tem uma grande afinidade por hidroxiapatitas e íons de cálcio. Além dos grupamentos fosfato, ligado ao carbono, existe uma cadeia química curta, responsável pela ligação do fármaco ao tecido ósseo. Também ligada ao carbono, existe uma cadeia química longa, que determina as propriedades químicas, o modo de ação e a potência do bisfosfonato (OTOMO-CORGEL, 2007).

Tais compostos funcionam como potentes inibidores da reabsorção óssea e têm um largo uso no tratamento de uma variedade de doenças com excesso de reabsorção óssea, como metástase óssea, hipercalcemia, osteoporose e doença de Paget (DOUGLAS *et al*, 1980; MUNDY e YONEDA, 1998). Quando administrados oral ou parentalmente, eles são absorvidos por cristais de hidroxiapatita no mineral ósseo e, uma vez que sua estrutura torna-os resistentes a degradação enzimática, eles atuam principalmente inibindo a reabsorção óssea, embora algum efeito na formação óssea também deva ocorrer. O efeito em rede é promover acumulação mineral no osso enquanto, ao mesmo tempo, promover a redução do turnover ósseo consideravelmente (ALLGROVE, 1997).

Um estudo afirma que os bisfosfonatos são seletivamente selecionados pelos osteoclastos na matriz óssea contendo hidroxiapatita e têm vários efeitos diretos a nível celular. Eles inibem o recrutamento e diferenciação de precursores de osteoclastos, além de inibir a atividade de reabsorção dos osteoclastos maduros. Somado a isso, os bisfosfonatos induzem a apoptose de macrófagos e osteoclastos maduros. É afirmado que osteoclastos intercalados com bisfosfonatos mostram mudanças morfológicas, tais como deficiência da borda de absorção ou dilaceração do anel de actina (MURAKAMI *et al*, 1995).

Evidências têm demonstrado que alguns efeitos desses compostos nos osteoclastos são mediados diretamente via osteoblastos. Tais efeitos indiretos nos osteoclastos parecem ter a ver com a secreção de fatores pelos osteoblastos, como a interleucina-6, que regulam a diferenciação e ativação de osteoclastos (VITTE, FLEISCH e GUENTHER, 1996). Além disso, bisfosfonatos têm demonstrado capacidade de aumentar a proliferação, diferenciação e atividade ósseo-formadora de osteoblastos diretamente. Assim, tais estudos sugerem que os bisfosfonatos afetam o metabolismo ósseo via ambos osteoclastos e osteoblastos (GARCIA-MERCO *et al*, 1998).

Alguns autores acreditam que a dose de bisfosfonatos influencia o metabolismo ósseo. Altas doses de bisfosfonatos danificam a mineralização, enquanto baixas doses não afetam a mineralização e função dos osteoblastos, mas inibem a reabsorção osteoclástica. Não foi elucidada como a concentração de bisfosfonatos afeta os osteoblastos e outras células ósseas *in vivo* (SANDERES *et al*, 1998). Há evidências que indicam que dentro da dose de ativação osteogênica (10^{-6} - 10^{-9} M), o pamidronato (bisfosfonato) afeta a linhagem de células osteoblásticas via seu efeito anti-apoptótico nos osteoblastos e osteócitos (PLOTKIN *et al*, 1999).

Em estudo recente foi demonstrado que a atividade da fosfatase alcalina das células osteoblásticas cultivadas em placas de titânio com superfície contendo bisfosfonatos aumentou. Esse resultado sugere que os bisfosfonatos na superfície do titânio reagem diretamente nas células osteoblásticas e influenciam a diferenciação das células, indicando que não há efeito tóxico nas células osteoblásticas. Assim, os autores concluem que implantes de titânio com bisfosfonatos evidentemente provêm um micro-ambiente favorável com habilidades osteogênicas (YOSHINARI *et al*, 2002).

Atualmente, é considerado que as propriedades de inibição da reabsorção óssea por parte dos bisfosfonatos agem nos osteoclastos por dois mecanismos que são dependentes da presença de nitrogênio na cadeia química longa ligada ao carbono. Assim, os bisfosfonatos são classificados em 2 grupos com diferentes mecanismos de ação: os bisfosfonatos nitrogenados e os não-nitrogenados. Os bisfosfonatos que não têm o nitrogênio presente em sua estrutura (etidronato, clodronato e tiludronato) inativam análogos não-hidrolizáveis de ATP, que interferem na energia celular dos osteoclastos, induzindo sua apoptose. Os bisfosfonatos mais potentes, que contém nitrogênio em sua estrutura (pamidronato, alendronato, ibandronato, risedronato e zoledronato), agem por quatro mecanismos distintos: (1) inativando o ATP; (2) inibindo a síntese de farnesil difosfonato (parte do mecanismo do mevalonato na síntese do colesterol), resultando em desestruturação citoesquelética do osteoclasto, desregulamento do transporte intracelular e inibição da proliferação celular; (3) reduzindo o recrutamento de osteoclastos e (4) induzindo a produção por parte dos osteoblastos de uma enzima de inibição da reabsorção óssea (OTOMO-CORGEL, 2007).

Muitos estudos têm demonstrado que os bisfosfonatos têm efeitos prolongados ou persistentes, em animais e humanos, o que provavelmente está relacionado com a taxa e

extensão de absorção química e sua liberação do tecido ósseo mediada por células (FAIRNEY *et al*, 1998; KHAN *et al*, 1999; RAVN *et al*, 2000; REID *et al*, 2002; WATTS *et al*, 2004). A afinidade de um bisfosfonato pelo tecido ósseo parece ser relacionada à sua estrutura química, uma vez que os bisfosfonatos nitrogenados demonstraram apresentar uma capacidade de inibição da dissolução mineral mais forte. Tais diferenças na afinidade pela hidroxiapatita parecem influenciar no tempo necessário para que a reabsorção óssea deixe de ser afetada pela ação dos bisfosfonatos mesmo após a interrupção da terapia com essa droga (NANCOLLAS *et al*, 2006).

A velocidade para que seja revertido o efeito do bisfosfonato após a interrupção do tratamento com essa droga depende não somente da sua composição, mas também da dose empregada, do tempo de tratamento e da população estudada (NANCOLLAS *et al*, 2006). Assim, mulheres em período logo após a menopausa que se submeteram a um estudo tiveram o efeito do bisfosfonato revertido mais rapidamente que mulheres de mais idade, nas quais o *turnover* ósseo é mais lento (RAVN *et al*, 2000). Informações publicadas sugerem que os efeitos do etidronato administrado ciclicamente devam ser revertidos dentro de um ano após a suspensão do tratamento (FAIRNEY *et al*, 1998); e um estudo recente demonstra que isso também é verdadeiro para o risedronato (WATTS *et al*, 2004). A literatura mostra, porém, que o zoledronato pode sustentar a inibição da reabsorção por no mínimo um ano após uma única aplicação intravenosa de 4mg (REID *et al*, 2002). A administração oral do alendronato na dose de 10mg/dia durante 5 anos resultou em efeito do medicamento por mais 5 anos após a interrupção do tratamento; e quando o mesmo alendronato foi administrado via parental por 3 dias, seu efeito perdurou por no mínimo mais um ano (KHAN *et al*, 1998). Em geral essas diferenças clínicas dos bisfosfonatos em

termos de persistência de efeito somente demonstram sua afinidade indiscutível e prolongada à hidroxiapatita (NANCOLLAS *et al*, 2006).

3.5 Imobilização de bisfosfonatos em superfície de titânio

Devido a severos efeitos colaterais terem sido reportados pelo uso sistêmico do bisfosfonato em humanos, métodos de entrega local dessa medicação são usados para prevenir ou reduzir os efeitos adversos sistêmicos (MERAW e REEVE, 1998). É afirmado que os bisfosfonatos aumentam a taxa de formação precoce de tecido ósseo ao redor de implantes dentários pela aplicação local de alendronato em implantes de titânio cobertos por hidroxiapatita após a implantação. Além disso, foi demonstrado que a aplicação local não produziu efeitos colaterais sistêmicos (MERAW, REEVE e WOLLAN, 1999).

A aplicação local, entretanto, não imobiliza diretamente o bisfosfonato na superfície dos implantes, e isso seria um fator importante para o efeito dos bisfosfonatos durante toda a formação óssea peri-implantar. Pensando dessa forma, um grupo de pesquisadores investigou a eficiência das modificações de superfície do titânio pela imobilização de bisfosfonatos em camadas de íons de cálcio e finas coberturas de hidroxiapatita, *in vitro*. A atividade da fosfatase alcalina de células osteoblásticas e os efeitos inibitórios na aderência inicial da *P. gingivalis* foram avaliados. A atividade da fosfatase alcalina nas culturas de células osteoblásticas em placas com bisfosfonato imobilizado foi quase a mesma das placas de titânio maquinado, indicando que a imobilização do bisfosfonato não mostrou efeitos tóxicos nas células osteoblásticas, e que isso indica um micro-ambiente favorável, com habilidade osteogênica. Dados de aderência de bactéria oral mostraram que a superfície de titânio com bisfosfonato imobilizado inibiu a aderência inicial de *P. gingivalis*. Análise de espectroscopia fotoeletrônica de raiosX sugeriu que superfícies de

titânio modificadas com implantação de íons de cálcio e finas camadas de hidroxiapatita causaram a imobilização do bisfosfonato nas placas de titânio. Espectros de N1s e P2p, originários dos bisfosfonatos, foram observados em ambas superfícies de íons de cálcio implantados ou cobertura de hidroxiapatita, tanto no momento inicial como após o bombardeamento com íons de argônio. Tais resultados indicam que a modificação do Ti, tanto com implantação de íons de cálcio como com finas coberturas de hidroxiapatita, é útil para a imobilização dos bisfosfonatos, e que os bisfosfonatos imobilizados não são facilmente removidos com limpeza ultrassônica devido a sua marcante afinidade aos compostos de cálcio. Outra implicação desses resultados é que os bisfosfonatos têm uma afinidade não somente por fosfato de cálcio mas também por outros compostos do cálcio, como a superfície de titânio com cálcio implantado. Na implantação de íons de cálcio, a superfície do titânio é modificada com uma camada desses íons de aproximadamente 7-12 μ m de espessura, que consiste em CaTiO₃ e TiO₂. Essa camada modificada é comparativamente estável, com o resultado de que o bisfosfonato imobilizado mantém-se na superfície modificada. A eficiência do bisfosfonato é esperada em estender-se nas vizinhanças do implante devido à dissolução gradual dessas coberturas. A liberação do bisfosfonato ocorreria durante um longo período de tempo, a despeito da grande afinidade de adesão já bem conhecida dos bisfosfonatos a hidroxiapatita (YOSHINARI *et al*, 2001).

Em um estudo com cães *beagle*, foi avaliada a resposta óssea a implantes de titânio tratados com uma fina cobertura de fosfato de cálcio e bisfosfonato inseridos em áreas edêntulas. Após o período de implantação de 12 semanas, a interface implante-tecido ósseo foi avaliada histológica e histomorfometricamente. A maior porcentagem de contato ósseo foi encontrada ao redor de implantes com bisfosfonato imobilizado. Segundo os autores,

existem 2 possíveis explicações para esse mecanismo: uma é que mais propriedades osteofílicas favoráveis, como alta taxa de ligação e proliferação celular, seriam responsáveis por esse mecanismo; a segunda possibilidade é que uma maior densidade mineral no tecido ósseo adjacente ao implante poderia ser responsável pela inibição da reabsorção óssea ou direta promoção de osteoblastos. Os resultados do estudo sugerem que uma camada fina de fosfato de cálcio, seguida de imobilização de bisfosfonato, é efetiva na promoção de osteogênese na superfície de implantes dentários, *in vivo* (YOSHINARI *et al*, 2002).

Outro estudo optou por avaliar a formação de tecido mineralizado, por cultura de células osteoblásticas, em titânio modificado pela implantação de camada de íons de cálcio e imobilização de bisfosfonato. Segundo os autores, esse tipo de estudo é raro na literatura, pois as colorações normalmente utilizadas para analisar deposição de tecido mineralizado, Von Kossa ou Vermelho de Alizarin, formam produtos reativos difíceis de serem reconhecidos na superfície de titânio. Dessa forma, desenvolveram um método de avaliação da formação de nódulos mineralizados utilizando calceína azul. Em seus resultados, obtiveram que a imobilização de bisfosfonatos (pamidronato e incadronato) no titânio impregnado por íons de cálcio estimula a formação de nódulos mineralizados. Entretanto, interessante, a taxa de formação de nódulos mineralizados com pamidronato foi melhor que com o incadronato, embora o incadronato iniba mais fortemente a reabsorção óssea que o pamidronato. Tais achados sugerem que a taxa de inibição da reabsorção óssea de um bifosfonato não reflete a taxa de ativação da formação óssea. Baseado nessa evidência, a imobilização de bisfosfonatos no titânio pode potencialmente melhorar a formação de tecido mineralizado ao redor de implantes dentários (GOTO *et al*, 2003).

Mais recentemente foi analisada, *in vivo*, a quantidade de tecido ósseo novo ao redor de implantes de titânio puro, com cobertura de íons de cálcio e com modificação dessa cobertura utilizando pamidronato, um bisfosfonato-nitrogenado. Após uma semana, mais neoformação óssea foi observada ao redor de implantes com imobilização de pamidronato que ao redor de implantes de titânio puro ou com cobertura de íons de cálcio. O mesmo foi observado após três semanas. Após quatro semanas, significativamente mais neoformação óssea foi detectada ao redor de implantes com bisfosfonato imobilizado que ao redor de implantes com cobertura de íons de cálcio ou de titânio puro. Os autores concluem que implantes com cobertura de íons de cálcio e bisfosfonatos-nitrogenados imobilizados poderão aumentar o sucesso da terapia de implantes em Odontologia e Ortopedia (KAJIWARA *et al*, 2005).

3.6 Cultura celular

A utilização de culturas celulares, com o objetivo de avaliar o efeito do substrato sobre o comportamento dos osteoblastos durante o processo de osseointegração, tem sido amplamente empregada na pesquisa em Implantodontia. Diversos eventos biológicos associados à cicatrização óssea sobre superfícies de implantes podem ser investigados com a utilização de culturas celulares apropriadas. Adesão, proliferação e diferenciação celular, assim como produção e mineralização de matriz extracelular, são alguns dos eventos que podem ser analisados isoladamente. Interpretações legítimas de experimentos *in vitro* devem ser discutidas em termos de limitações práticas, técnicas e biológicas referentes à utilização de culturas celulares. A utilização dessas culturas permite o acesso a informações celulares e moleculares que favorecem uma abordagem de engenharia nanoestrutural no desenho do implante e hipóteses significativas para serem testadas. Neste contexto, culturas

celulares oferecem uma oportunidade única dentro do processo e fenômeno de osseointegração (COOPER *et al*, 1998).

Para que se possa entender como acontece a osseointegração, é fundamental a descrição das etapas envolvidas. Pode-se distinguir três fases marcantes: a primeira fase compreende a migração de células osteogênicas diferenciadas para a superfície do implante; a segunda fase consiste na formação de osso através da mineralização da matriz interfacial e a terceira é o remodelamento ósseo ao redor do implante. O autor conclui, a partir de seu estudo, que os resultados do tratamento em Implantodontia são criticamente dependentes do desenho da superfície do implante, o qual otimiza a resposta biológica durante cada um destes três mecanismos distintos de integração (DAVIES, 1998).

Dentro da primeira fase, o evento inicial que ocorre é a adesão entre a célula e a superfície do implante. As características dessa superfície nessa situação são críticas para determinar a biocompatibilidade do material e sua utilidade em implantes osseointegráveis (LI *et al*, 2006). Para saber quais modificações de superfície do implante são efetivas na otimização da biocompatibilidade, o comportamento de osteoblastos nessa superfície é geralmente examinado. Osteoblastos são críticos para a osseointegração dos implantes porque eles sintetizam e produzem matriz extracelular e controlam sua mineralização. Dessa forma, o comportamento dos osteoblastos nos biomateriais *in vitro* pode prover informações sobre seu provável comportamento *in vivo* (BRUNETTE e CHEHROUDI, 1999).

A adesão celular inicial regula o comportamento celular subsequente no material, já que muitas células, como fibroblastos e osteoblastos são dependentes de ancoragem para sobreviver. A adesão inadequada nesses casos resulta em desestabilização do implante,

inibe regeneração e reparo tecidual, e aumenta as chances de infecção, o que potencialmente levará a rejeição e falha do implante (BRUNETTE e CHEHROUDI, 1999).

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 Processamento dos discos de titânio e disposição dos grupos

O material de implante utilizado nesse estudo foi o titânio disponível comercialmente (Ticp) (PROMM Indústria e Comércio de Materiais Cirúrgicos – Porto Alegre – Brasil), 99,9% puro, grau II. A partir desse material foram confeccionados 40 discos de 15mm de diâmetro e 1 mm de espessura (Figura 1). Esses discos foram processados de maneira a formar quatro grupos (n=10) de acordo com o tratamento de superfície recebido (Tabela 1).



Figura 1 - Discos de titânio: A. Diâmetro de 15mm; B e C. Espessura de 1mm, medida através de espessímetro.

Tabela 1 - Disposição dos grupos de estudo.

Grupo	n	Sigla	Tratamento de superfície	Delineamento experimental
1	10	CT	Nenhum – Ti maquinado	Controle
2	10	CA	Condicionamento ácido	Teste
3	10	HA	Recobrimento com Hidroxiapatita	Teste
4	10	BF	Imobilização de Bisfosfonato	Teste

4.2 Descrição do tratamento de superfície do titânio:

4.2.1 Titânio maquinado

Os discos foram utilizados exatamente como recebidos após o processo de corte e usinagem (PROMM Indústria e Comércio de Materiais Cirúrgicos – Porto Alegre – Brasil), sem nenhum tratamento adicional de caracterização dessa superfície. Antes das análises e do experimento, porém, os discos passaram por uma limpeza em banho ultrassônico com acetona PA (Cromato Produtos Químicos LTDA – São Paulo – Brasil) por 5 minutos e foram deixados secar naturalmente (Laboratório de Materiais Dentários, Faculdade de Odontologia, PUCRS).

4.2.2 Condicionamento ácido

O condicionamento ácido foi realizado através de imersão em solução de ácido hidrófluorídrico (HF) a 10% e ácido nítrico (HNO_3) a 5%, por 15 minutos, em temperatura ambiente. Após o condicionamento ácido, os discos foram lavados em ultrassom (Ultrasonic 1440 Plus – Odontobrás – Ribeirão Preto – Brasil), primeiramente em água destilada e posteriormente em acetona, durante 5 minutos, e secos delicadamente com jatos de ar (Laboratório de Materiais Dentários, Faculdade de Odontologia, PUCRS).

4.2.3 Aplicação da cobertura de hidroxiapatita

Após o condicionamento ácido, uma cobertura de hidroxiapatita foi sinterizada a partir de um pó de HA com pureza $\geq 90\%$ e tamanho de grão médio de $12\mu\text{m}$. Os discos foram colocados em um molde sobre uma base de aço inoxidável e, sobre os mesmos, foi

prensada uma película de HA por 01 minuto com uma carga de 10 toneladas em temperatura ambiente (Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Física, Parque Tecnológico - TECNOPUC, PUCRS).

4.2.4 Imobilização do bisfosfonato

As amostras passaram por imersão em uma solução ($10^{-2}M$) de pamidronato dissódico (dissódio 3-amino-1-hidroxi-propilideno-1, 1-bifosfonato pentahidratado – Pamidrom® - Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA – São Paulo, Brasil) com pH de 6.2 por 24 horas a 37°C, em estufa de culturas Modelo 002 CB (Fanem, São Paulo, Brasil) (Laboratório de Materiais Dentários, Faculdade de Odontologia, PUCRS). Após, foram limpos ultrassonicamente em água destilada, secados delicadamente com jato de ar e armazenados em um dessecador por 24 horas (Centro de Microscopia e Microanálises – CEMM, PUCRS) (YOSHINARI *et al*, 2001; YOSHINARI *et al*, 2002; GOTO *et al*, 2003; KAJIWARA *et al*, 2005).

4.3 Análise da amostra

Um espécime de cada grupo foi utilizado para análise qualitativa e quantitativa do tratamento de superfície realizado. Estes discos passaram pelas seguintes análises, na seguinte ordem:

- Fluorescência de raiosX;
- Difração de raiosX
- Rugosidade superficial;
- Microscopia eletrônica de varredura.

Assim, a análise foi realizada nos discos:

- a) como recebidos;
- b) após condicionamento ácido;
- c) após sinterização de hidroxiapatita;
- d) após imobilização de bisfosfonatos.

4.3.1 Análise de Fluorescência de RaiosX

Procedeu-se a Análise de Fluorescência de RaiosX (Labcenter XRF1800 – Shimadzu – Kyoto - Japão) em modo de dispersão de comprimento de onda com resolução de 10 ppm, em toda a amostra para avaliação da composição superficial dos discos e, conseqüentemente, da presença de contaminantes em sua superfície (Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Física, Parque Tecnológico - TECNOPUC, PUCRS). Este sistema permite medir a composição química dos materiais com precisão de partes por milhão. Desta forma podemos ter a composição química da superfície analisada com pelo menos quatro casas decimais a mais que o obtido por EDS nos equipamentos de MEV. O equipamento que foi utilizado permite obter uma varredura de composição na amostra (mapeamento) sem a necessidade de metalização das mesmas, o que faz com que não haja perda de informação devido à presença de ouro ou carbono.

A análise de Fluorescência de RaiosX foi realizada na amostra imersa em solução de pamidronato dissódico (Grupo Bifosfonato) também com a finalidade de avaliar se houve a imobilização de tais compostos na camada de fosfato de cálcio, o que determinará a utilidade dessa camada para tal fim.

4.3.2 Análise de Difração de RaiosX

Um espécime por grupo de tratamento de superfície foi submetido à análise de Difração de RaiosX (XRD 7000 – Shimadzu – Kyoto - Japão) com resolução de 0,0001 graus, a fim de que fosse verificada a cristalinidade do material e controlada a presença de fases cristalinas distintas no material em teste (Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Física, Parque Tecnológico - TECNOPUC, PUCRS).

4.3.3 Análise da rugosidade superficial

Avaliação quantitativa da rugosidade superficial da amostra foi realizada com auxílio de um perfilômetro (Surftest – SJ-201 – Mitutoyo – Japão) (Laboratório de Materiais Dentários, Faculdade de Odontologia, PUCRS). Tal aparelho gera um valor, em micrometros, correspondente à média aritmética dos picos mais altos e vales mais baixos do perfil (Ra) de uma superfície, caracterizando-a em mais lisa ou mais rugosa (WENNERBERG e ALBREKTSSON, 2004).

4.3.4 Microscopia e microanálise

A amostra foi analisada em Microscópio Eletrônico de Varredura (Philips XL30 – Eindhoven - Holanda), oportunidade na qual foi verificada a topografia da superfície com ampliações de 1000X ou mais, e procedida a avaliação de sua composição em pontos específicos através de análise química semi-quantitativa por energia dispersiva (EDS), com finalidade de comparação e confirmação com os resultados obtidos através da análise de Fluorescência de RaiosX (Centro de Microscopia e Microanálises – CEMM, PUCRS).

4.4 Esterilização da amostra

A esterilização foi realizada através de óxido de etileno (MICSteriliza, Esterilização de Produtos para Saúde, Porto Alegre, RS, Brasil), método indicado para produtos médico-hospitalares que não podem ser expostos ao calor ou agentes esterilizantes líquidos, prevenindo, dessa forma, que houvesse modificação da superfície de titânio.

4.5 Cultura de células osteoblásticas humanas (SaOS-2)

As amostras restantes (n=09/grupo) foram imersas em meio de cultura de células osteoblásticas derivadas de osteosarcoma humano (SaOS-2), as quais encontravam-se armazenadas por congelamento em nitrogênio líquido, a -196°C (Instituto de Pesquisas Biomédicas, PUCRS) (LORO, 2002). Tais células são largamente utilizadas em estudos de diferenciação, proliferação e metabolismo de células ósseas, e são conhecidamente capazes de produção óssea (OKUMURA *et al*, 2001).

Os diferentes tratamentos de superfície realizados foram avaliados quanto a sua habilidade de induzir adesão e proliferação celular. A análise foi efetuada por contagem de células, em sistema de simulação de um hemocitômetro (DE PARIS, 2004).

4.5.1 Meio de cultura celular

As células foram cultivadas em meio D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina e 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina. Um novo meio de cultura foi adicionado para ajuste da concentração celular. Uma suspensão com densidade de $0,5 \times 10^5$ células por mililitro de D-MEM, quantificada em hemocitômetro, foi adicionada em cada poço das

placas de cultura (2,5ml/poço), previamente preparados com a colocação de discos de cada grupo de tratamento de superfície em seu interior (Figura 2). A cultura foi, então, incubada a uma temperatura de 37°C, em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ (Fanem – São Paulo – Brasil) (DE PARIS, 2004). Controle de pH do meio de cultura foi realizado durante todo o período nos diferentes grupos testados.

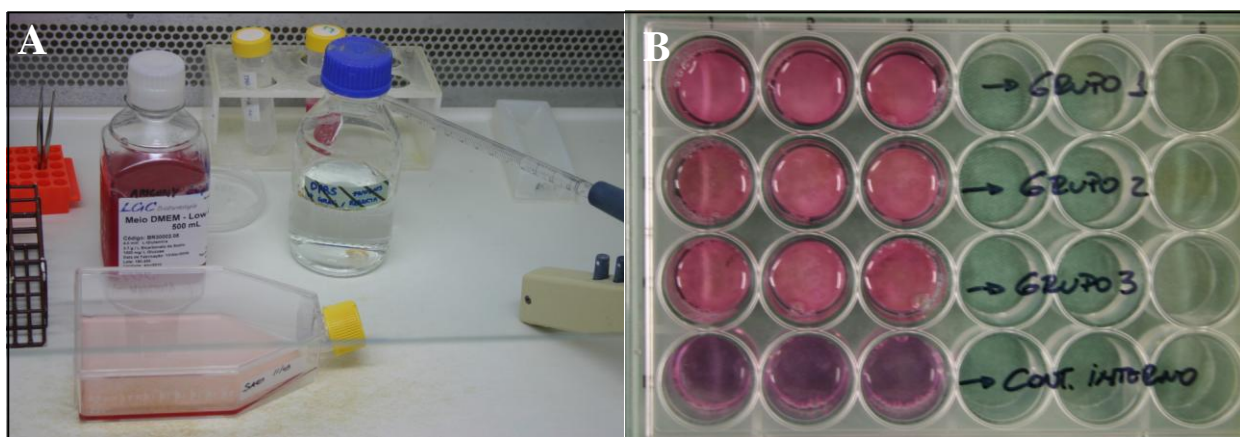


Figura 2 - A. Material utilizado para cultura celular; B. Discos posicionados nos poços das placas de cultura, com a suspensão de células no meio de cultura.

4.5.2 Análise celular quantitativa

Para a determinação do número de células, os discos de titânio foram micrografados em microscópio óptico sob luz ultravioleta (Axiolab, FT 400 – Zeiss - Alemanha), em um aumento de 50x (Instituto de Pesquisas Biomédicas, PUCRS).

Para tal análise, um processo de coloração dos núcleos com o agente intercalante de DNA, Iodeto de Propídio, foi realizado. O meio de cultura foi removido dos poços, e os discos lavados com 200µl/poço de DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) por duas vezes. Após, os discos foram cobertos com 200µl de Iodeto de Propídio durante 5 minutos.

Os mesmos foram removidos dos poços com o auxílio de uma pinça delicada e colocados sobre lâminas para análise e realização das micrografias dos núcleos celulares sobre as superfícies em microscópio óptico sob luz ultravioleta (DE PARIS, 2004) (Figura 3).



Figura 3 - Microscópio óptico conectado a um computador, utilizado para realização das imagens para contagem celular.

Cada disco foi virtualmente dividido em 9 partes iguais e as micrografias foram realizadas em 5 partes pré-determinadas, a fim de que fossem realizadas as contagens celulares (Figura 4). A imagem de cada parte micrografada foi digitalizada em computador através de um sistema de processamento de imagens, utilizando um *scanner*, em padrão único de medida (27x18cm) e sobre ela foi traçada uma grade com retângulos padronizados (2,5x 3,25cm), simulando um hemocitômetro. As imagens foram transferidas para um programa Microsoft *PowerPoint*® (SILVA JÚNIOR, 2003). Assim, o número de células

por campo pôde ser quantificado. As células foram identificadas pela coloração de seus núcleos com o Iodeto de Propídio. Foram considerados 14 campos por imagem, em cada grupo e período de tempo, e, destes, calculada uma média (DE PARIS, 2004) (Figura 5). A contagem de células foi realizada ao final de 3, 7 e 14 dias.

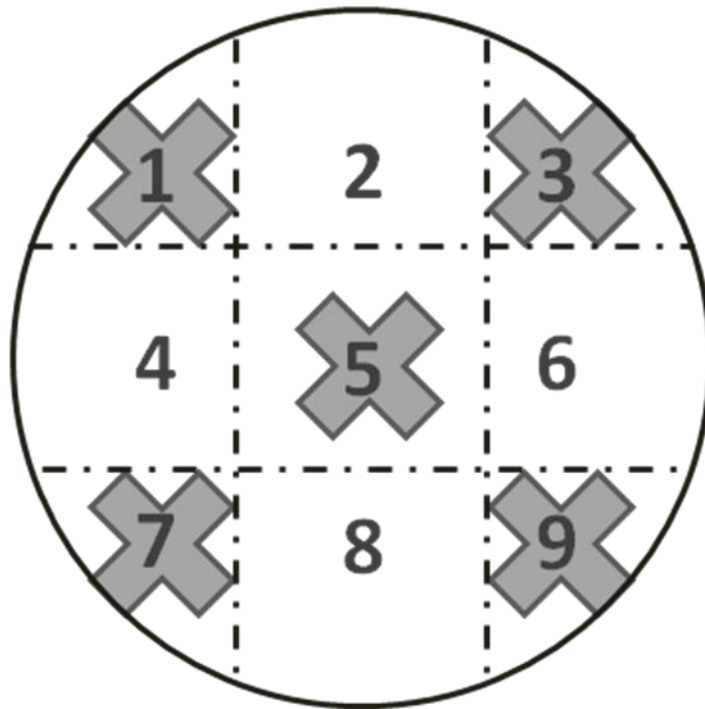


Figura 4 – Desenho esquemático da divisão de cada disco da amostra em nove partes, das quais cinco (demarcadas por um “x”: 1, 3, 5, 7 e 9) eram micrografadas e utilizadas para contagem celular.

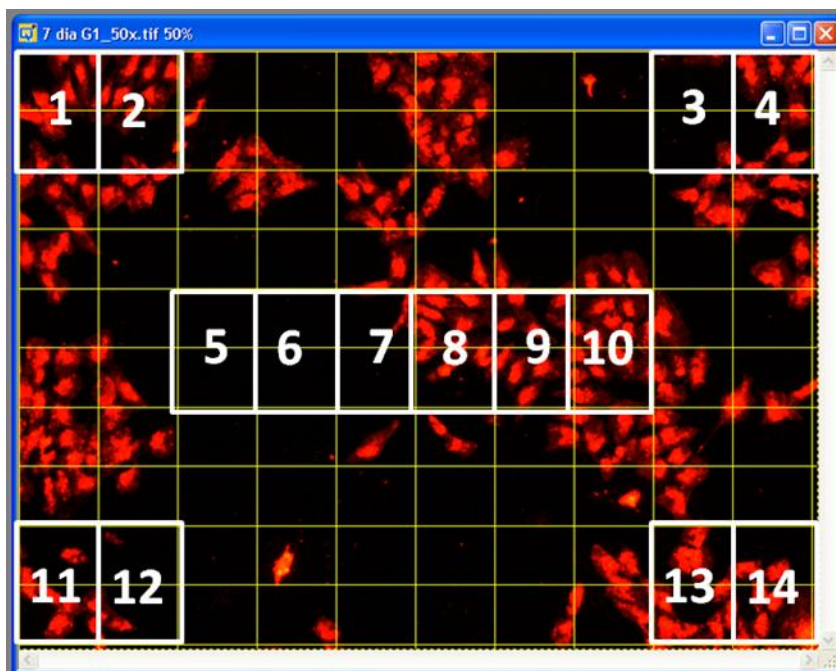


Figura 5 - Representação do processo de contagem celular através de grade traçada com 14 retângulos padronizados de 2,5 x 3,25 cm. O programa utilizado foi o *Microsoft PowerPoint*® 2003.

A análise estatística da contagem celular foi realizada através de tabelas, gráficos, estatísticas descritivas (média e desvio-padrão) e testes paramétricos.

Para processamento e análise dos dados foi utilizado o *software* estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 13.0, adotando-se o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da amostra

5.1.1 Análise de Fluorescência de RaiosX (XRF)

Os resultados da análise de Fluorescência de RaiosX estão sintetizados na Tabela 2. Tais resultados nos mostram que a superfície de titânio cp maquinado apresentou-se contaminada com traços de carbono (menos que 1% em peso) e razoável quantidade de nitrogênio (30,79%), além de outros componentes que, juntos, não chegam a somar 1% em peso. O condicionamento ácido do titânio promoveu uma limpeza de sua superfície, confirmando a natureza do Titânio grau II, comercialmente puro, que contém 99% desse elemento em sua composição. Também podemos constatar que não houve resquícios dos ácidos aplicados para o tratamento de superfície e que poderiam estar contaminando-a.

Quanto ao Grupo 3, podemos verificar a presença de componentes químicos típicos de um fosfato de cálcio como a hidroxiapatita: o oxigênio (O), o fósforo (P) e o cálcio (Ca). A inexistência de outros elementos químicos leva à constatação de que a superfície não se apresenta contaminada ou que a hidroxiapatita utilizada não contém impurezas.

No Grupo 4, verifica-se, além da presença dos componentes característicos da hidroxiapatita (O, P e Ca) aplicada na sua superfície, um quarto componente que é o sódio (Na). Uma vez que o bisfosfonato aplicado tem em sua composição duas ligações de sódio por molécula (pamidronato dissódico), podemos confirmar a presença desse composto farmacológico e comprovar a utilidade da cobertura de hidroxiapatita conforme realizada nessa pesquisa para fins de imobilização deste bisfosfonato na superfície do titânio.

Tabela 2 - Composição química superficial por análise de XRF (%).

Grupo	Ti	O	C	P	Ca	N	Na	Outros*
1	54.32	14.10	0.29	-	-	30.79	-	0.48
2	99.82	-	-	-	-	-	-	0.17
3	0.84	55.46	-	17.08	26.53	-	-	0.06
4	11.98	54.29	-	14.63	18.85	-	0.17	0.05

5.1.2 Análise de Difração de RaiosX (XRD)

Os resultados da análise de Difração de RaiosX estão expostos na Figura 5.

O Grupo 2 apresenta picos de difração característicos do titânio (100, 101, 102 e 002). O Grupo 3 apresenta picos característicos da cristalinidade da hidroxiapatita (211, 222 e 300), demonstrando algum pico de difração do titânio subjacente.

Pela análise do Grupo 4, podemos constatar picos muito similares ao Grupo 3, referentes à hidroxiapatita, e alguns picos referentes ao titânio. A inexistência de nenhuma outra mudança expressiva em comparação ao Grupo 3 nos leva a constatar que a imobilização do pamidronato dissódico na superfície do titânio viabilizada pelo recobrimento com a hidroxiapatita não ocasionou nenhuma mudança em sua cristalinidade.

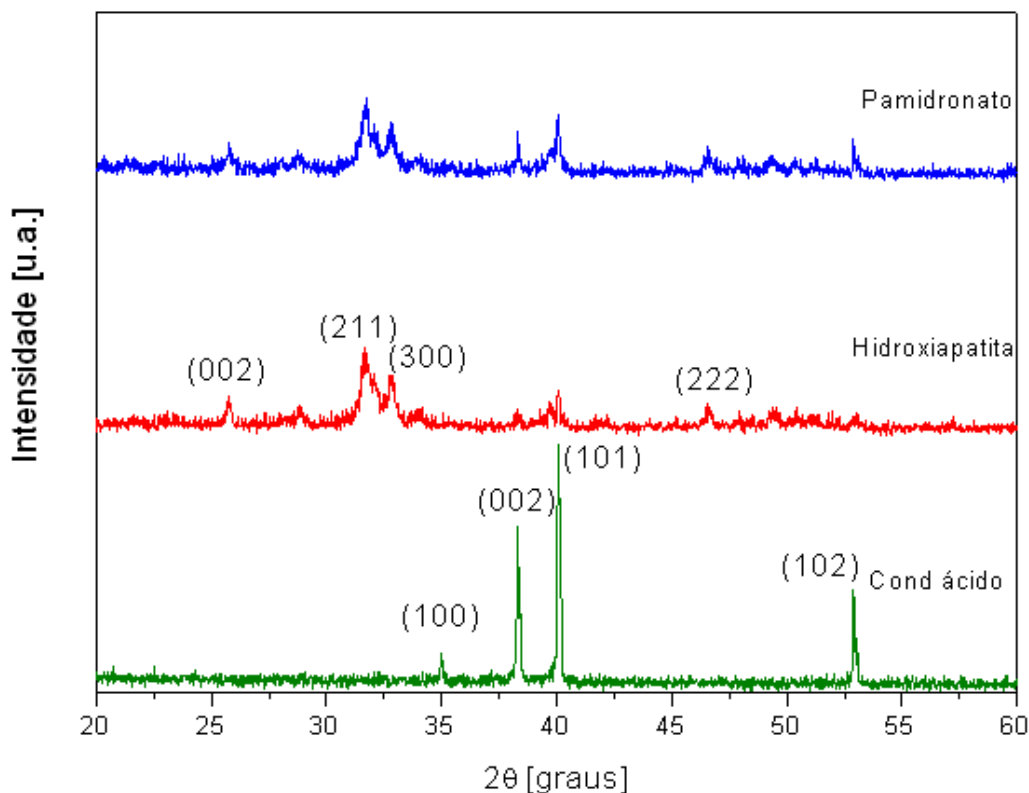


Figura 6 - Diagrama da análise de difração de raiosX da amostra: em verde, grupo que recebeu tratamento superficial com condicionamento ácido; em vermelho, grupo que recebeu cobertura com hidroxiapatita; em azul, grupo que foi imerso em solução de pamidronato dissódico.

5.1.3 Análise da rugosidade superficial

Avaliação da rugosidade superficial da amostra foi realizada com auxílio de um perfilômetro. O resultado da análise (Tabela 3) expressa que os grupos 3 e 4 apresentaram os valores de rugosidade aritmética média (Ra) mais baixos e, portanto, contituem-se em superfícies mais lisas. A maior rugosidade superficial foi encontrada na amostra submetida ao condicionamento ácido.

Tabela 3 - Valores médios de rugosidade superficial da amostra estudada.

Grupo	Ra (μm)
1	0.34
2	0.49
3	0.08
4	0.05

5.1.4 Microscopia e microanálise

Imagens de MEV dos diferentes tratamentos de superfície apresentam-se na Figura 6 e caracterizam a análise qualitativa das superfícies. A superfície de titânio comercialmente puro maquinado apresenta ranhuras paralelas, originadas pelo corte e polimento superficial realizado no processamento das peças para uso comercial (Figura 6a). Os discos de titânio que sofreram condicionamento ácido apresentam uma microestrutura complexa de superfície, exibindo cavidades de diversas formas e extensões (Figura 6b). A superfície do titânio com cobertura de hidroxiapatita apresentou desde áreas cobertas por uma camada densa de HA (Figura 6c) a áreas apresentando esparsos grãos de HA sobre a superfície, revelando o padrão de condicionamento pela solução ácida. No grupo que sofreu a imobilização do pamidronato, a superfície apresentava-se topograficamente similar ao grupo fosfato de cálcio (Figura 6d).

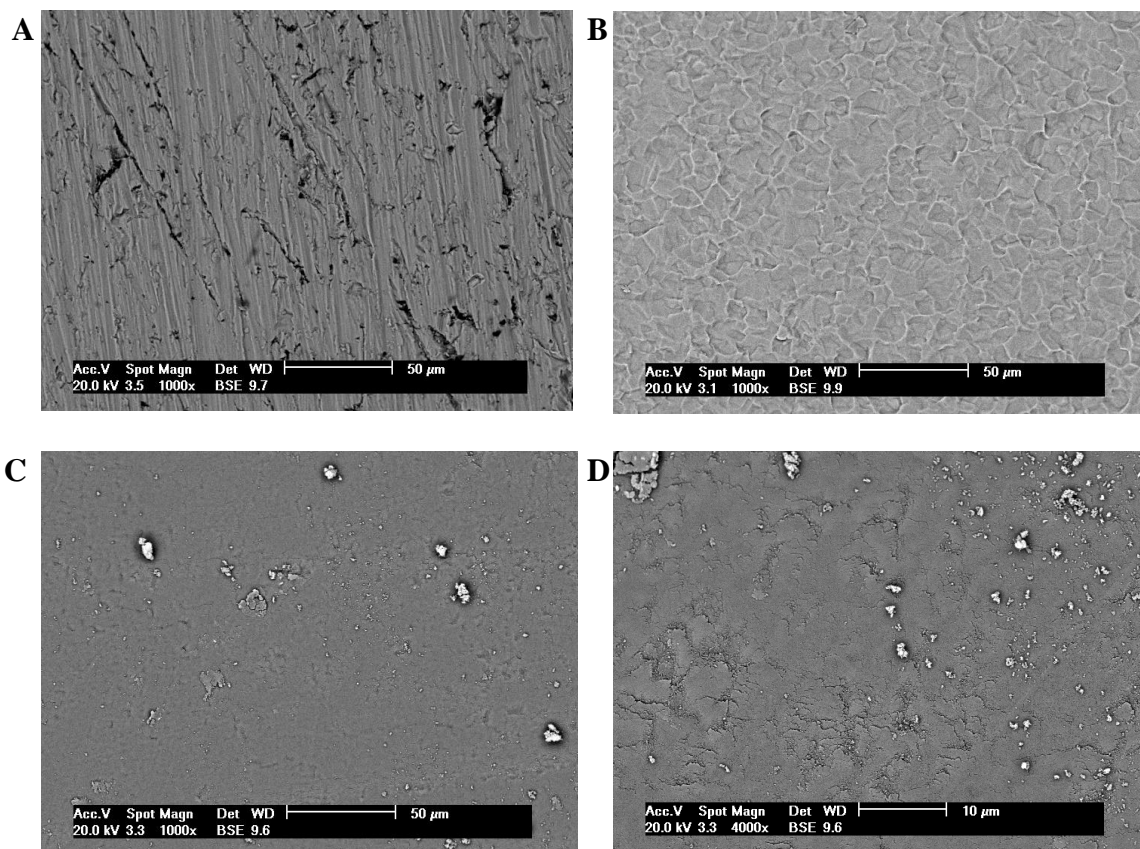


Figura 7 - Imagens de MEV - A. Superfície do titânio maquinada; B. Superfície de titânio tratada com condicionamento ácido; C. Titânio com densa cobertura de hidroxiapatita; D. Superfície da amostra que foi imersa em pamidronato dissódico em maior aumento.

Análise química semi-quantitativa por energia dispersiva (EDS) foi realizada nos diferentes tratamentos de superfície conforme a Tabela 4. A superfície do titânio cp maquinado apresentou-se contaminada com traços (menos de 1% em peso) de alumínio. A superfície ácido-condicionada do titânio mostrou constituir-se 100% de titânio, demonstrando que o processo de condicionamento ácido promoveu a “limpeza” superficial do titânio disponível comercialmente. A amostra que recebeu cobertura com HA apresentou os elementos constituintes dessa substância em sua superfície, comprovando a pureza das partículas utilizadas no estudo, sem a presença de quaisquer elementos

contaminantes. No grupo que foi submerso em solução de pamidronato dissódico, pode-se observar o aparecimento do elemento sódio (Na) na superfície onde antes somente aparecia Ca, P e O (constituintes da HA), comprovando a presença do bisfosfonato e, conseqüentemente, a utilidade da cobertura de HA conforme realizada no estudo para fins de imobilização deste biomodulador ósseo na superfície do titânio.

Tabela 4 - Composição superficial por análise de EDS (%).

Grupo	Ti	O	C	P	Ca	N	Na	Outros
1	99.26	-	-	-	-	-	-	0.74
2	100.00	-	-	-	-	-	-	-
3	-	20.66	-	28.81	50.53	-	-	-
4	-	17.77	-	31.38	49.81	-	1.04	-

5.2 Cultura celular

Células osteoblásticas derivadas de osteossarcoma humano (SaOS-2) foram avaliadas na presença de discos de titânio que receberam tratamentos de modificação de sua superfície, em relação a seus aspectos de adesão e proliferação, nos períodos experimentais de três, sete e 14 dias de cultura.

Os campos foram avaliados através de micrografias digitalizadas em *scanner*, após sua execução em microscópio óptico, sob luz ultravioleta, em aumento de 50X. O número de células osteoblásticas, por campo, aderidas aos substratos, foi quantificado. As células eram identificadas pela coloração de seus núcleos com Iodeto de Propídio. Foram considerados 14 campos por grupo, em cada período de tempo, e, destes, calculada uma média. Micrografias obtidas e utilizadas na contagem celular estão divididas por tempo de cultura e expostas nas páginas a seguir.

As contagens celulares foram tabuladas em planilhas e analisadas por meio de estatísticas descritivas no programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 13.0. Após verificação da normalidade de distribuição (Teste de Shapiro-Wilk) e homocedacidade (Prova de Levene), as médias de contagem celular foram comparadas entre os grupos por meio de Análise de Variância a dois fatores. De forma a elucidar o efeito do fator tratamento de superfície, os dados foram comparados por meio de ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey, mantendo um mesmo período de tempo (3 dias, 7 dias, 14 dias). O efeito do tempo foi verificado comparando-se grupos de mesmo tratamento de superfície também por meio de ANOVA complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

As médias e desvio-padrão da contagem celular para cada grupo em cada período experimental estão expostos no Gráfico 1. Os resultados obtidos através da análise estatística desses dados estão expostos na Tabela 5.

Em linhas gerais, ambos os fatores, tipo de tratamento de superfície e tempo, bem como a interação de ambos, significativamente afetam o crescimento celular ($p=0,032$; $p=0,000$; $p=0,001$, respectivamente).

Gráfico 1 - Contagem de células nos diferentes períodos de cultura, em todos os grupos estudados.

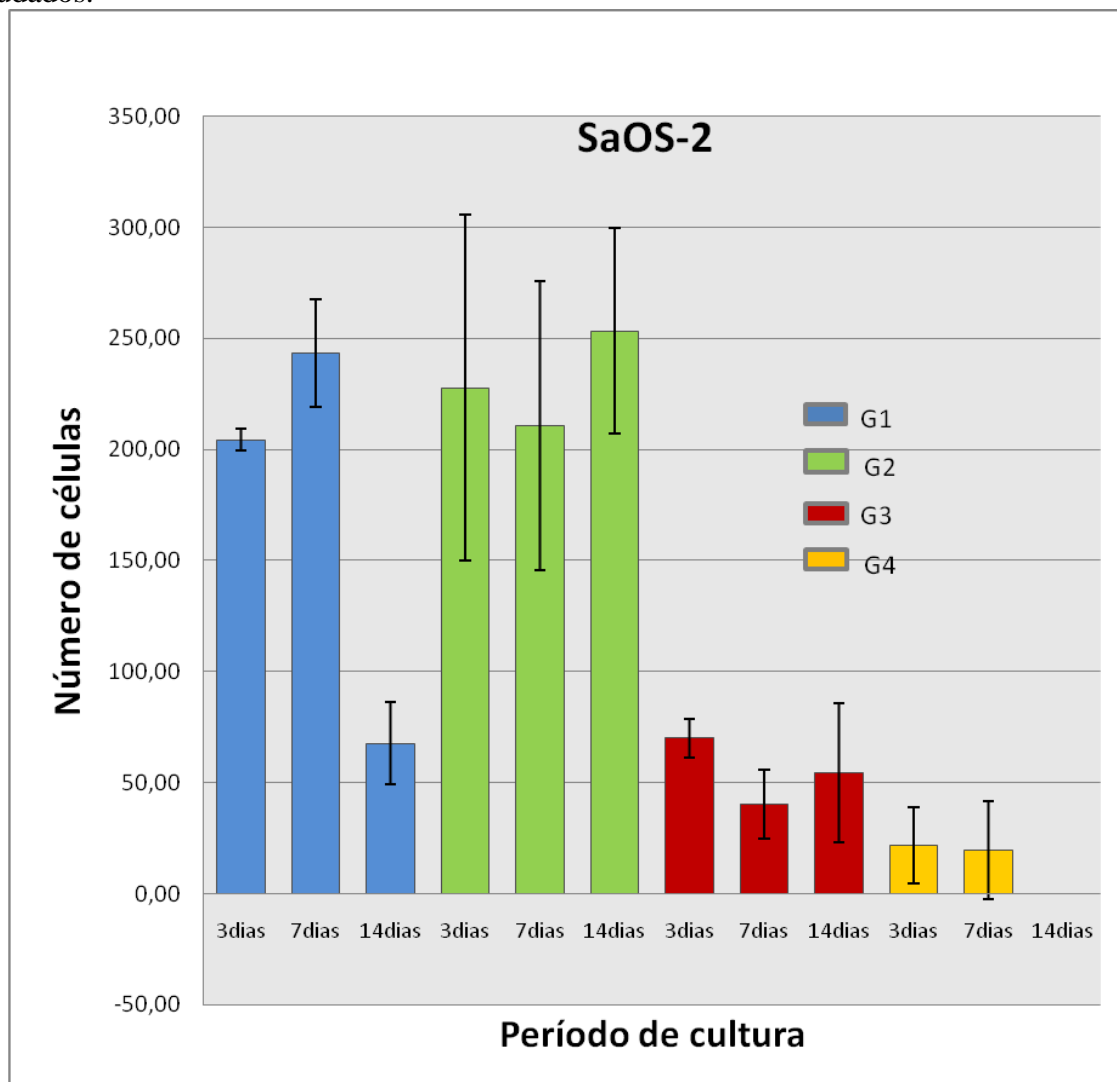


Tabela 5 - Média (desvio-padrão) de crescimento celular para cada tipo de tratamento nos diferentes tempos experimentais.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
3dias	204.33 (4.73) Aa	227.67 (77.82)Aa	70.00 (8.88) Ba	21.67 (17.03) Ba
7dias	243.33 (24.11)Aa	210.67 (65.21) Aa	40.33 (15.56) Ba	19.67 (22.05) Ba
14dias	67.67 (18.339)Bb	253.33 (46.31) Aa	54.33 (31.47) Ba	0*

* Todas as amostras sem células.

Para cada linha, os valores com letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os tipos de tratamento.

Para cada coluna, os valores com letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos ($p < 0,05$).

5.2.1 Comparação entre os períodos de tempo

Através dos resultados do teste estatístico Análise de Variância (ANOVA), verifica-se que, no Grupo 1 (titânio maquinado), existe diferença significativa no período de tempo de 14 dias em relação aos demais. Há uma diminuição no número de células osteoblásticas, aos 14 dias, quando comparado aos períodos de três e sete dias ($p < 0,05$). Embora os períodos de 3 e 7 dias não apresentem diferença estatisticamente significativa, aos 7 dias há um aumento no número de células em relação ao período de 3 dias.

No grupo 2 (titânio ácido-condicionado), os resultados indicam que não há diferença estatisticamente significante no número de células cultivadas nos diferentes períodos de tempo estudados. No entanto, verifica-se uma queda na contagem celular comparando-se os períodos de 3 e 7 dias. Comparando-se os períodos de 3 e 7 dias com 14 dias, verifica-se um aumento numérico na proliferação celular.

Os resultados do Grupo 3 (cobertura de hidroxiapatita) indicam que não há diferença estatisticamente significante no número de células cultivadas nos diferentes períodos de tempo estudados. Entretanto, verifica-se uma queda na contagem celular comparando-se os períodos de 3 e 7 dias, e 3 e 14 dias. Comparando-se os períodos de 7 e 14 dias, verifica-se um aumento numérico na proliferação celular.

Através dos resultados obtidos no Grupo 4 (imobilização de bisfosfonato), pode-se inferir que não há diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 3 e 7 dias, embora haja uma queda no número de células aos sete dias em comparação com o período de 3 dias. Em função de que no período de 14 dias não foi encontrada nenhuma célula aderida ao substrato da amostra, este período de tempo de cultura experimental não pôde ser incluído na análise estatística. Entretanto, este é um dado de relevante importância visto que em nenhum disco da amostra as células osteoblásticas se proliferaram ou conseguiram

permanecer aderidas. Numericamente, houve um decréscimo na contagem celular até atingir o valor nulo (zero) com o passar do tempo.

5.2.2 Comparação entre os tipos de tratamentos de superfície

Foi realizada uma comparação entre o número médio de células observadas nos diferentes grupos estudados dentro de um mesmo período de tempo, para todos os tempos estudados.

No período experimental de 3 dias, houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos 1 e 3, 1 e 4, 2 e 3, 2 e 4 ($p < 0,05$). A maior diferença constatada refere-se aos Grupos 2 e 4: foi obtida uma média de células no Grupo 2 que chegou a ser quase dez vezes superior ao número médio de células contadas no Grupo 4. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos 1 e 2, bem como entre os Grupos 3 e 4. O padrão de proliferação celular em cada grupo aos 3 dias de cultura pode ser observado através das micrografias obtidas (Figura 7).

No período experimental de 7 dias, houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos 1 e 3, 1 e 4, 2 e 3, 2 e 4 ($p < 0,05$). A maior diferença constatada refere-se aos Grupos 1 e 4: foi obtida uma média de células no Grupo 1 que chegou a ser cerca de doze vezes superior ao número médio de células cultivadas no Grupo 4. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos 1 e 2, bem como entre os Grupos 3 e 4. O padrão de proliferação celular em cada grupo aos sete dias de cultura pode ser observado através das micrografias obtidas (Figura 8).

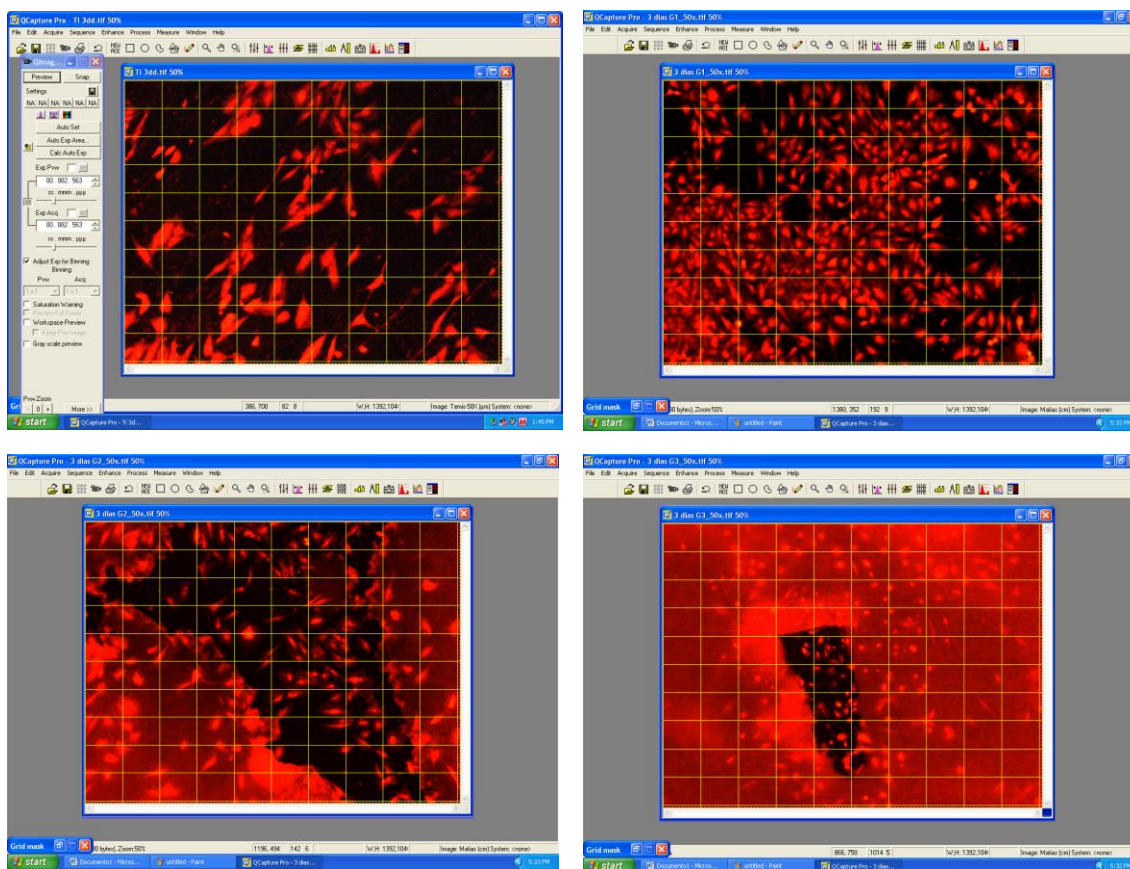


Figura 8 - Imagens de microscopia óptica em 50X de aumento da proliferação celular em 3 dias de cultura nos diferentes grupos: A. Titânio maquinado; B. Titânio ácido-condicionado; C. Titânio coberto com hidroxiapatita; D. Titânio com cobertura de hidroxiapatita que foi imerso em pamidronato dissódico.

No período experimental de 14 dias, houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos 1 e 2, bem como entre os Grupos 2 e 3 ($p < 0,05$). A maior diferença constatada refere-se aos Grupos 2 e 3: foi obtida uma média de células no Grupo 2 que chegou a ser cerca de quatro vezes superior ao número médio de células cultivadas no Grupo 3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos 1 e 3. O Grupo 4 não pôde ser incluído na análise estatística em função de ser observada a ausência de células aderidas ao substrato estudado neste período de tempo. O padrão de proliferação

celular nos Grupos 1, 2 e 3 aos 14 dias de cultura, bem como a ausência de células aderidas no Grupo 4, podem ser observados através das micrografias obtidas (Figura 9).

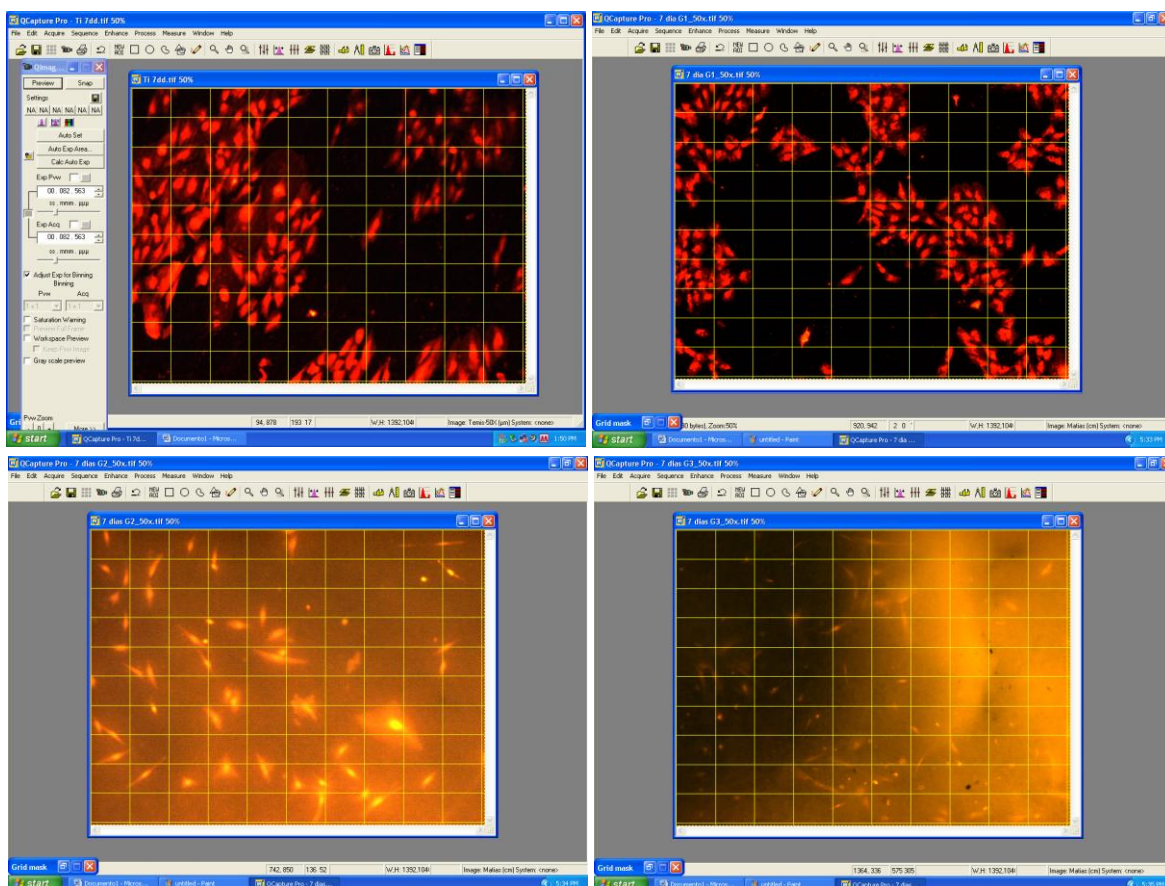


Figura 9 - Imagens de microscopia óptica em 50X de aumento da proliferação celular em 7 dias de cultura nos diferentes grupos: A. Grupo 1; B. Grupo 2; C. Grupo 3; D. Grupo 4.

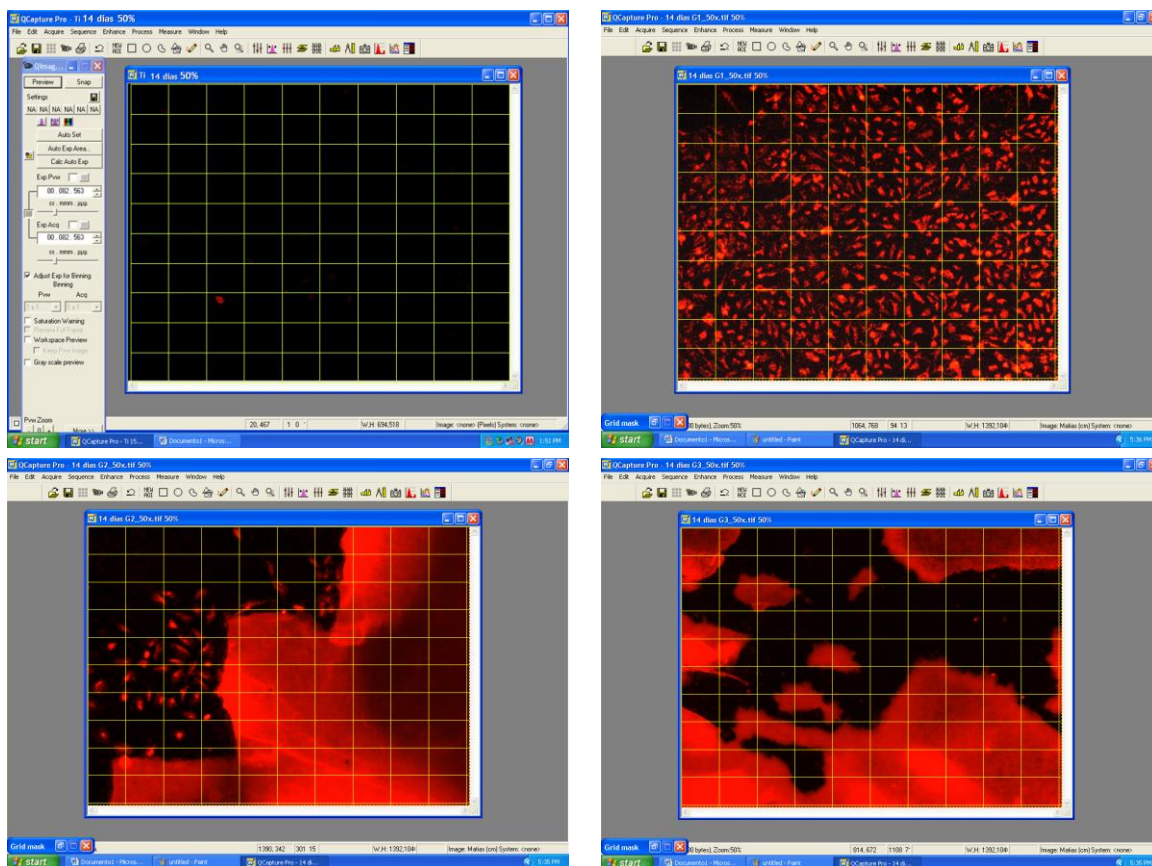
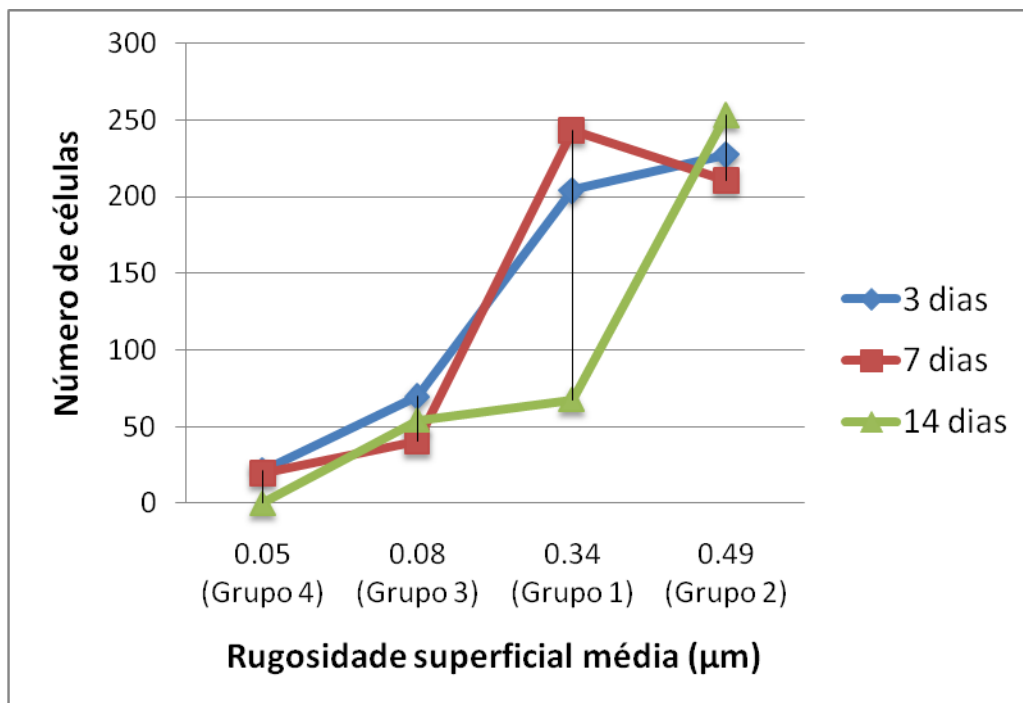


Figura 10 - Imagens de microscopia óptica em 50X de aumento da proliferação celular em 14 dias de cultura nos diferentes grupos: A. Grupo 1; B. Grupo 2; C. Grupo 3; D. Grupo 4.

Os diferentes grupos estudados foram, ainda caracterizados quanto à sua rugosidade de superfície. A relação entre a rugosidade superficial média dos grupos e a contagem celular nos diferentes períodos de tempo pode ser analisada no Gráfico 2. Pode-se afirmar que os fatores têm uma relação crescente diretamente proporcional, com exceção do período de 7 dias de cultura, entre os grupos 1 e 2, no qual houve um decréscimo na contagem celular sem significância estatística com o aumento da rugosidade superficial.

Gráfico 2 – Relação entre rugosidade superficial média e crescimento celular nos períodos de cultura experimentais.



DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A análise de Fluorescência de RaiosX (XRF), utilizada nesta pesquisa, é uma das técnicas de análise mais potentes para determinação simultânea da composição química das amostras e espessura da camada dos materiais. A técnica é rápida, precisa e potencialmente exata (HUANG, 1991). Segundo Huang (1991), o dispositivo apresenta um sistema detector usado para medir o ângulo de incidência e a intensidade dos picos da fluorescência dos átomos da amostra, identificando qualitativamente e quantitativamente os elementos presentes.

Batuman *et al* (1989), realizou um estudo *in vivo* de biópsias ósseas usando XRF e constatou que a técnica é segura, rápida e não invasiva. Além disso, o autor considera o método prático para o monitoramento da eficácia da terapia instituída.

A análise por Difração de RaiosX (XRD), também utilizada na caracterização das amostras deste estudo, é uma técnica única para identificar as fases cristalinas presentes no material e serve também para mensurar as propriedades de uma estrutura quanto a distorções, tamanho da partícula, composição e defeitos de estrutura (TONEY E BRENNAN, 1989).

Segundo Suda, Takayama e Otsuka (2008) a análise através de XRD foi estabelecida como um método não-invasivo sem necessidade de contato. A energia dispersada pelo dispositivo possui um feixe policromático e a difração de todas as camadas atômicas é obtida simultaneamente. Além disso, o XRD pode ser usado para detectar possíveis transformações de fase e a microscopia eletrônica de varredura pode ser associada para o estudo da topografia das amostras.

A análise de XRD é muito importante em aplicações tecnológicas devido a sua capacidade de determinar com exatidão a disposição dos átomos presentes na amostra. Seu uso se tornará cada vez mais importante no futuro por usar a radiação como instrumento analítico para caracterização do material em estudo (TONEY E BRENNAN, 1989).

A análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), forma imagens essencialmente tridimensionais com grande profundidade de foco. A amostra a ser analisada fica dentro de uma câmara em alto vácuo, sendo irradiada por elétrons. Portanto as amostras devem apresentar uma estabilidade a essas condições, para, desta forma, evitar efeitos de carregamento e distorções na imagem. Assim, é importante que as amostras sejam fixadas, desidratadas e metalizadas, para então serem analisadas no MEV. Em função disso, a microscopia eletrônica de varredura é considerada uma análise destrutiva, uma vez que modifica a superfície da amostra irreversivelmente (DEDAVID, GOMES e MACHADO, 2007).

O MEV pode ser utilizado tanto para análise de topografia quanto para análise de composição superficial (DEDAVID, GOMES e MACHADO, 2007). Embora a análise de topografia seja extremamente interessante, uma vez que atinge a escala nanométrica, em nosso estudo, a análise de composição de superfície realizada através do MEV foi menos precisa que a conseguida com um aparelho de Fluorescência de RaiosX. Assim, foi realizada a análise de composição de superfície através dos dois aparelhos citados, para confirmação e comparação de resultados.

Em trabalho de Szmukler-Moncler, Testori e Bernard (2004), foram comparadas as topografias de superfície de quatro sistemas de implante disponíveis comercialmente a fim de que fosse checada a reprodutibilidade dos processos industriais de ataque ácido. Como conclusão, os autores destacam que as superfícies de titânio tratadas com ácido não

conseguem criar uma topografia padrão reproduzível. Essa topografia varia de acordo com vários parâmetros como a composição da solução ácida, a temperatura e o tempo de ataque ácido.

Em função desta falta de padronização dos fabricantes de implantes, neste trabalho os discos de titânio foram imersos em uma solução de ácido fluorídrico (HF) e ácido nítrico (HNO_3) por 15 minutos para texturização da superfície, formando o Grupo CA. A decisão foi baseada em trabalho de Silva (2004), no qual foi avaliada a proliferação e diferenciação de células derivadas da medula óssea humana cultivadas sobre discos de titânio com diferentes rugosidades de superfície, onde se utilizou a mesma metodologia de cultura e quantificação celular deste experimento. Através de análise quantitativa do número de células aderidas sobre as superfícies nos diferentes períodos de cultura e da detecção de proteínas ósseo-específicas, como osteopontina e osteocalcina, foram testados discos de titânio tratados com HF/ HNO_3 por períodos de 15 e 30 minutos. Diferença significativamente maior na quantidade de células foi encontrada no grupo do titânio condicionado por 15 minutos e os níveis de expressão das proteínas ósseo-específicas estavam marcadamente aumentadas, embora sem diferença significativa entre si, nos grupos que receberam condicionamento ácido, em comparação com espécimes de superfície lisa. O resultado gerado pela avaliação da rugosidade superficial de nosso estudo no grupo que recebeu ataque ácido ($R_a=0.49\mu\text{m}$) confirmou o padrão alcançado por Silva (2004) em seu grupo condicionado com a mesma solução ácida em mesmas condições de tempo e temperatura ($R_a=0.50\mu\text{m}$).

Na literatura atual, diversas formas de recobrir o titânio com fosfatos de cálcio têm sido relatadas com a finalidade de imobilização de um bisfosfonato, baseado na conhecida

afinidade deste biomodulador ósseo com o cálcio (YOSHINARI *et al*, 2000; GOTO *et al*, 2003; KAJIWARA *et al*, 2005; LANGHOFF *et al*, 2008).

Yoshinari *et al* (2000) promoveu a modificação da superfície do titânio pela implantação de íons de Ca e pelo recobrimento com hidroxiapatita. Ambas as superfícies foram confeccionadas utilizando-se um aparelho IBDM (*Ion Beam Dynamic Mixing*) sob vácuo, e as amostras contendo hidroxiapatita foram aquecidas até 700°C. Após a confecção de tais camadas, os discos de titânio foram imersos em uma solução de pamidronato dissódico. A estrutura do bisfosfonato foi encontrada na superfície das amostras através de análise em Espectrocópio Fotoeletrônico de RaiosX.

No estudo de LANGHOFF *et al* (2008), a superfície de fosfato de cálcio foi formada utilizando assistência eletroquímica em uma solução aquosa contendo íons de cálcio e fosfato. A cobertura consistiu em 2 fases de fosfato de cálcio: hidroxiapatita e brushita. Também foi utilizado um método de anodização que permite a formação de uma camada de óxido anódico e a incorporação de fases do fosfato de cálcio, criando uma superfície porosa dessa estrutura. A imobilização do bisfosfonato foi realizada através de imersão em solução de alendronato, mas nada foi descrito quanto à verificação da presença deste componente na superfície das amostras.

Em nosso estudo, a formação de uma camada de fosfato de cálcio na superfície de titânio foi realizada utilizando partículas de hidroxiapatita de alta pureza, as quais foram prensadas sob 10 toneladas de carga no titânio subjacente. O processo gerou uma camada fina de hidroxiapatita, possibilitando que os discos fossem imersos em uma solução de pamidronato dissódico. A imobilização deste bisfosfonato foi comprovada através da análise de fluorescência de RaiosX e EDS, os quais determinaram a presença de Na na superfície analisada. A pequena quantidade de sódio percebida pelas análises pode estar

relacionada a também pequena quantidade de fosfato de cálcio utilizada para cobertura do disco de titânio e que tem a capacidade de ligar-se a esse fármaco. Em nosso estudo houve, portanto, a confirmação da imobilização do pamidronato dissódico na camada de hidroxiapatita e a comprovação de que a cobertura de fosfato de cálcio confeccionada pode ser útil para essa finalidade.

Pesquisas que avaliam quais modificações na superfície de titânio são mais efetivas para otimizar a osseointegração, geralmente utilizam o comportamento de osteoblastos humanos. Duas linhagens osteoblásticas têm sido extensivamente utilizadas para esse fim: MG63 e SaOS-2, ambas derivadas de osteosarcomas humanos. Shapira e Halabi (2009), surpresos por encontrar muito pouca literatura comparando o comportamento dessas células em cultura, desenvolveram um estudo para comparar proliferação, morfologia, atividade de fosfatase alcalina e produção de osteocalcina nessas duas linhagens celulares. Em seus resultados, encontraram que células MG63 estão mais relacionadas à pré-osteoblastos, com fenótipo mais imaturo; células SaOS-2 revelaram um fenótipo osteoblástico mais maduro, em comparação com células MG63, constituindo um perfil preferencial para modelos de estudos *in vitro* de osseointegração.

Em nosso estudo, osteoblastos derivados de osteosarcoma humano (SaOS-2), foram cultivadas em meio de cultura convencional suplementado com 10% de soro fetal bovino. Keller *et al* (2003) constatam, ao examinar a morfologia celular na superfície do material de estudo, a adesão e a rápida proliferação quando as culturas são realizadas na presença de 10% de soro fetal bovino no meio de cultura. O mesmo não é observado pelos autores em culturas livres de soro, onde não há substancial proliferação celular.

Nesta pesquisa foi proposta a avaliação celular nos períodos de 3, 7 e 14 dias. As células utilizadas foram osteoblastos, as quais possuem a característica de serem

dependentes da adesão a um substrato para que possam proliferar. Em estudos anteriores (LORO, 2002; DE PARIS, 2004; SILVA, 2004) foram utilizados, além dos períodos supracitados, a análise celular no período de 21 dias. Tais estudos constataram a morte de muitas células neste último período de tempo, devido à falta de substrato para que pudessem seguir proliferando. A constatação concorda com as observações realizadas por Silva Júnior (2003), que descreveu um comportamento confluyente a partir dos 15 dias, onde provavelmente não havia mais espaço na superfície da amostra para o crescimento celular. Tais informações foram levadas em consideração pelo fato de que os espécimes (discos de titânio) utilizados em nosso estudo apresentavam a mesma forma e dimensão daqueles utilizados nos estudos supracitados.

A análise celular quantitativa foi realizada a partir da coloração dos núcleos celulares com iodeto de propídio, baseada na escolha de 14 campos de imagem digitalizada da microscopia óptica. Mesma metodologia já foi utilizada por Loro (2002), Silva Júnior (2003), De Paris (2004) e Silva (2004), razão pela qual foi adotada em nossa pesquisa.

Em uma revisão sistemática da literatura, Wennerberg e Albrektsson (2009) avaliaram os efeitos da topografia de superfície do titânio na osseointegração de implantes orais. Em suas considerações ressaltam que um grande número de estudos têm claramente demonstrado que a resposta óssea é influenciada pela topografia de superfície do titânio ao nível micrométrico. Há um consenso geral de que tornar a superfície rugosa acima do nível encontrado na maioria das superfícies polidas e/ou maquinadas leva a uma resposta óssea mais forte. Em seus resultados, encontraram que superfícies ácido-condicionadas demonstram melhor osseointegração que superfícies maquinadas, em animais. Os autores discutem que alguns ácidos podem ser utilizados para remover uma pequena quantidade de material e criar pequenos poros em sua superfície, aumentando minimamente sua

rugosidade. Tal procedimento, mais do que aumentar a rugosidade superficial, transforma uma superfície anisotrópica em uma isotrópica. Entretanto, em seus resultados constatam que o fator isotropia/anisotropia parece ser não ter importância para incorporação do implante no tecido ósseo. Uma explicação para a diferença de resultados em grupos de rugosidade superficial tão similares, segundo os autores, seria que alguma indicação existe de que a topografia de superfície influencia a resposta óssea também a nível nanométrico. Em nosso estudo, a diferença de rugosidade superficial entre os grupos 1 ($R_a=0.34\mu\text{m}$) e 2 ($R_a=0.49\mu\text{m}$) foi mínima. Entretanto, a análise quantitativa de proliferação celular obteve diferença significativa entre esses grupos no período de 14 dias, confirmando a influência da topografia na resposta celular conforme citado pelos autores acima.

Em nosso estudo, os grupos 3 e 4, recobertos com hidroxiapatita conforme metodologia já citada, obtiveram os piores resultados de adesão e proliferação celular. O principal fator que pode ter contribuído para esse resultado é que, através do teste de rugosidade superficial, tais grupos obtiveram uma topografia de superfície muito lisa, não favorável a osseointegração, conforme estudo recentemente realizado (WENNERBERG e ALBREKTSSON, 2009). Em nossos resultados, pôde-se observar que os grupos de valor de rugosidade superficial média mais baixo (Grupos 3 e 4) obtiveram resultados estatisticamente menores de contagem celular em comparação com aqueles de rugosidade superficial maior (Grupos 1 e 2), nos períodos de 3 e 7 dias. No período de 14 dias, o grupo de maior rugosidade superficial entre todos (Grupo 2) obteve resultados significativamente maiores que os demais grupos.

Um fator citado por Wennerberg e Albrektsson (2004) que também pode explicar os resultados alcançados pelos grupos 3 e 4, é que é de relevante importância que o implantes de superfície bioativa, como os recobertos com hidroxiapatita, devam ter ancoragem

biomecânica em adição à adesão química para alcançarem sucesso. A vantagem teórica dos implantes bioativos seria, segundo os autores, de tornar a ligação biomecânica mais rápida em comparação com implantes que não possuem tais superfícies, necessitando do contato osso-implante para desenvolver suas habilidades osseointegradoras.

Baxter *et al* (2002) realizaram estudo da adesão e morfologia de osteoblastos e fibroblastos sobre superfícies de fosfato de cálcio. Em seus resultados, na superfície tratada com hidroxiapatita, observou-se muito pouco espalhamento em ambos os tipos celulares e a menor medição de cobertura celular em área. Além disso, os osteoblastos não estavam intimamente associados ao substrato, com a maior parte do corpo celular encontrando-se acima da superfície. Os autores afirmam que seus resultados foram surpreendentes, uma vez que a hidroxiapatita é tida como um material biocompatível que pode acelerar as propriedades de reparo ósseo. Em nosso estudo, também se esperava uma superfície favorável à adesão e proliferação celular no grupo com cobertura de hidroxiapatita, fato que, claramente, não foi evidenciado em nossos resultados.

Em estudo realizado por Schliephake *et al* (2009) foi testada a hipótese de que a adição de coberturas de fosfato de cálcio ao titânio com superfície ácido-condicionada melhorariam a regeneração óssea peri-implantar. Em conclusão, os autores afirmam que não houve a confirmação da hipótese admitida, ou seja, que a cobertura com hidroxiapatita não aumentou a formação óssea periimplantar quando comparada com titânio que sofreu somente ataque ácido como caracterização de superfície. Tal resultado corrobora os encontrados em nosso estudo, onde a adição de uma cobertura de hidroxiapatita na superfície condicionada não melhorou os valores de adesão e proliferação celular encontrados no grupo que somente recebeu condicionamento ácido. De forma contrária, os

resultados do Grupo HA foram significativamente menores que os encontrados no Grupo CT e CA em todos os períodos estudados.

A proliferação de células osteoblásticas sobre o substrato de HA é superior aos três dias de cultura, quando comparado aos períodos de sete e 14 dias. Aos sete dias, há uma queda no número médio de células cultivadas sobre a superfície de HA e essa média volta a crescer aos 14 dias. Observação semelhante foi realizada por De Paris (2004), que relata uma alta proliferação celular sobre substrato de hidroxiapatita até o terceiro dia de cultura; proliferação que decresce após seis a oito dias de cultura. Exatamente esse padrão de crescimento celular sobre a hidroxiapatita repetiu-se em nosso estudo.

Segundo Wennerberg e Albrektsson (2004), as propriedades que determinam a qualidade de uma superfície de implante dentário dividem-se em mecânicas, topográficas e físico-químicas. Essas propriedades estão inter-relacionadas e irão, em conjunto, determinar a capacidade da superfície de permitir a osseointegração. Embora, atualmente, a composição química seja o principal foco dos estudos envolvendo superfície de implantes orais, deve-se levar em consideração todas as propriedades que influenciam a resposta óssea. Em nosso estudo, acreditamos que não foi atingido o objetivo de avaliar a influência do bisfosfonato como biomodulador ósseo, em função de termos imobilizado tal composto em uma superfície de topografia considerada desfavorável à adesão e proliferação celular (WENNERBERG e ALBREKTSSON, 2009). Os resultados do grupo 4 não foram significativamente diferentes dos obtidos no grupo 3, embora tenham sido em números menores. Uma vez que fatores que poderiam determinar tal comportamento, como alteração do pH do meio de cultura celular ou presença de contaminantes na superfície analisada, foram controlados, tal fato pode ser um reflexo isolado da topografia similar dos dois

grupos que foram recobertos pela hidroxiapatita e não necessariamente de suas diferenças químicas.

Entretanto, um fato instigante é a ausência de células aderidas e de quaisquer indícios de proliferação celular aos 14 dias de cultura no Grupo 4. Soma-se a esse fato o padrão decrescente na contagem celular com o passar do tempo no Grupo 4 contrastando com o aumento numérico observado entre os períodos de sete e 14 dias no Grupo 3. Aventa-se a hipótese de algum tipo de influência do pamidronato dissódico nestas constatações, como, por exemplo, uma concentração deste fármaco não favorável ao crescimento osteoblástico ou até mesmo tóxico a essas células.

Segundo Plotkin *et al* (1999) há evidências que indicam que a dose de ativação osteogênica de um bisfosfonato está entre 10^{-6} e 10^{-9} M. Em nosso estudo, entretanto, foi utilizada a concentração de 10^{-2} M (mais alta), exatamente conforme metodologia apresentada por Yoshinari *et al* (2002), estudo que teve como resultados que o pamidronato nessa concentração não possui efeito tóxico nas células osteoblásticas e, pelo contrário, criam um micro-ambiente favorável ao crescimento celular com habilidades osteogênicas.

Apesar disso, Sanderes *et al* (1998) considera que ainda não foi elucidada como a concentração de bisfosfonatos afeta os osteoblastos, sugerindo mais pesquisas para esclarecer tais mecanismos.

De acordo com esta pesquisa, mais pesquisas são necessárias para elucidar a influência de um bisfosfonato imobilizado na superfície do titânio na adesão e proliferação de osteoblastos humanos.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A metodologia empregada na realização deste experimento permite concluir, a partir da análise *in vitro* da adesão e proliferação de células osteoblásticas humanas, que:

- a) O recobrimento da superfície do titânio com hidroxiapatita conforme metodologia desta pesquisa é eficaz na imobilização de um bisfosfonato.
- b) A imobilização do pamidronato dissódico na superfície do titânio não alterou a cristalinidade da camada de hidroxiapatita usada para esse fim.
- c) A análise por XRF é mais precisa para determinação da composição superficial de uma amostra quando comparada com a análise de EDS por MEV.
- d) A superfície de titânio, seja ela maquinada ou ácido-condicionada, obteve melhores resultados de adesão e proliferação de células de fenótipo osteoblástico quando comparada com superfícies de hidroxiapatita, *in vitro*.
- e) A superfície ácido-condicionada do titânio obteve resultados significativamente melhores de contagem celular que as demais superfícies no período de 14 dias.
- f) O tipo de tratamento de superfície do titânio e período de cultura celular, bem como a interação de ambos, significativamente afetam o crescimento celular.
- g) A modificação na superfície do titânio através de condicionamento ácido conforme realizado nesse estudo favorece, *in vitro*, a adesão e proliferação de células de linhagem osteoblástica (SaOS-2), negando a hipótese nula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albrektsson T, Wennerberg A. Oral Implants surfaces: part I- review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 2004;17:536-543.

Allgrove J. Bisphosphonates. *Arch Dis Child* 1997;76:73-75.

Batuman V, Wedeen RP, Bogden JD, Balestra DJ, Jones K, Schidlovsky G. Reducing bone lead content by chelation treatment in chronic lead poisoning: An in vivo X-ray fluorescence and bone biopsy study. *Environ Res* 1989, 48(1):70-75.

Baxter LC, Frauchiger V, Textor M, Gwynn I, Richards RG. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. *Eur Cell Mater* 2002;4:1-17.

Brunette DM, Chehroudi B. The effect of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. *J Biomech Eng* 1999;121:49-57.

Buser D, Nydegger T, Hirt HP, Cochran DL, Nolte LP. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:611-9.

Cooper LF, Masuda T, Yliheikkilä PK, felton DA. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:163-174.

Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 1998;11:65-74.

Dedavid BA, Gomes CI, Machado G. *Microscopia Eletrônica de Varredura – Aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60p.

De Paris MF. *Avaliação da proliferação e diferenciação de células da medula óssea humana cultivadas sobre discos de hidroxiapatita e titânio*. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

Denissen H, Martinetti R, Lingen A, Hooff A. Normal osteoconduction and repair in and around submerged highly bisphosphonate-complexed hydroxyapatite implants in rat tibiae. *J Periodontol* 2000;71:272-278.

Douglas DL, Russel RGG, Kanis JA, Preston CJ, Preston FE, Preston MA, Woodhead JS. Effect of dichloromethylene diphosphonate in Paget's disease of bone and in hypercalcaemia due to primary hyperparathyroidism or malignant disease. *Lancet* 1980;1:1043-1047.

Fairney A, Kyd P, Thomas E, Wilson J. The use of cyclical etidronate in osteoporosis: changes after completion of 3 years treatment. *Br J Rheumatol* 1998;37:51-6.

Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998;19:80-100.

García-Merco C, Serrano S, Nacher M, Farré M, Díez A, Marinoso ML, Carbonell J, Mallibovsky L, Nogués X, Ballester J, Aubía J. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone* 1998;22:233-9.

Geurs NC, Jeffcoat RL, McGlumphy EA, Reddy MS, Jeffcoat MK. Influence of implant geometry and surface characteristics on progressive osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17(6):811-815.

Goto T, Kajiwara H, Yoshinari M, Fukuhara E, Kobayashi S, Tanaka T. In vitro assay of mineralized-tissue formation on titanium using fluorescent staining with calcein blue. *Biomaterials* 2003;24:3885-3892.

Hence LL, Wilson J. *Introduction to bioceramics*. Singapore: Word Scientific Publishing Co Pte Ltd, p.1-15, 1993.

Hong JY, Kim YJ, Lee HW, Lee WK, Ko JS, Kim HM. Osteoblastic cell response to thin film of poorly crystalline calcium phosphate apatite formed at low temperatures. *Biomaterials* 2003;24:2977-2984.

Huang HH, Ho CT, Lee HT, Lee TL, Liao KK, Chen FL. Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. *Biomol Eng* 2004;21:93-97.

Jinno T, Kirk SK, Morita S, Goldberg VM. Effects of calcium ion implantation on osseointegration of surface-blasted titanium alloy femoral implants in a canine total hip arthroplasty model. *J Arthroplasty* 2004;19(1):102-9.

Kajiwara H, Yamaza T, Yoshinari M, Goto T, Iyama S, Atsuta I, Kido MA, Tanaka T. The bisphosphonate pamidronate on the surface of titanium stimulates bone formation around tibial implants in rats. *Biomaterials* 2005;26:581-587.

Keller JC, Schneider GB, Stanford CM, Kellogg B. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant Dent* 2003;12(2):175-181.

Khan AS, Kanis JA, Vasikaran S, Kline WF, Matuszewski BK, McCloskey EV, *et al*. Elimination and biochemical responses to intravenous alendronate in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1997;12:1700-7.

Langhoff JD, Voelter K, Scharnweber D, Schnabelrauch M, Schlottig F, Hefti T, *et al*. Comparison of chemically and pharmaceutically modified titanium and zirconia implant surfaces in dentistry: a study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008;37:1125-1132.

Li C, Gao S, Terashita T, Shimokawa T, Kawahara H, Matsuda S, Kobayashi N. In vitro assays for adhesion and migration of osteoblastic cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Cell Tissue Res* 2006;324:369-375.

Loro, RCD. *Estudo in vitro da osteoindução de células da medula óssea humana*. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford JJ, 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.

Massas R, Pitarui S, Weinreb MM. The effects of titanium and hydroxyapatite on osteoblastic expression and proliferation in rat parietal bone cultures. *J Dent Res* 1993;72:1005-8.

Masuda T, Yliheikkilä PK, Felton DA, Cooper LF. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part I: In vivo studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13-17-29.

Medeiros EB. *Estudo do titânio como material biocompatível*. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1992.

Meraw SJ, Reeve CM. Qualitative analysis of peripheral peri-implant bone and influence of alendronate sodium on early bone regeneration. *J Periodontol* 1999;70:1228-1233.

Meraw SJ, Reeve CM, Wollan PC. Use of alendronate in peri-implant defect regeneration. *J Periodontol* 1999;70:151-158.

Misch CM. Hydroxyapatite-coated implants. Design considerations and clinical parameters. *N Y State Dent J* 1993;59(5):36-41.

Mundy GR, Yoneda T. Bisphosphonates as anticancer drugs. *N Engl J Med* 1998;339:398-400.

Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S, Nakamura I, Zhang D, Barbier A, Suda T. A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: tildronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. *Bone* 1995;17:137-44.

Nancollas Gh, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, Mangood A, Russell RGG, Ebetino FH. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 2006;38:617-627.

Okumura A, Goto M, Goto T, Yoshinari M, Masuko S, Katsuki T, Tanaka T. Substrate affects the initial attachment and subsequent behavior of human osteoblastic cells (Saos-2). *Biomaterials* 2001;22:2263-2271.

Otomo-Corgel J. Implants and oral bisphosphonates: Risky Business? *J Periodontol* 2007;78(3):373-6.

Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 1999;104:1363-74.

Puleo DA, Thomas MV. Implant Surfaces. *Dent Clin North Am* 2006;50:323-338.

Ravn P, Weiss SR, Rodriguez-Portales JA, McClung MR, Wasnich RD, Gilchrist NL, et al. Alendronate in early postmenopausal woman: effects on bone mass during long-term treatment and after withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1492-7.

Reid IR, Brown JP, Burckhardt P, Horowitz Z, Richardson P, Trechsel U, et al. Intravenous zoledronic acid in post menopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2002;346:653-61.

Ronold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE. Analysing the optimal value for titanium implant roughness in bone attachment using a tensile test. *Biomaterials* 2003;24:4559-4564.

Sanderes JL, Tarjan G, Foster SA, Stern PH. Alendronate/interleukin-1 β cotreatment increases interleukin-6 in bone and UMR-106 cells: dose dependent and relationship to the antiresorptive effect of alendronate. *J Bone Miner Res* 1998;13:786-92.

Schleiphake H, Aref A, Scharnweber D, Röhler S, Sewing A. Effect of modifications of dual acid-etched implant surfaces on periimplant bone formation. Part II: Calcium phosphate coatings. *Clin Oral Impl Res* 2009;20:38-44.

Shapira L, Halabi A. Behavior of two osteoblast-like cells lines cultured on machined and rough titanium surfaces. *Clin Oral Impl Res* 2009, 20:50-55.

Silva TSN. *Efeito da rugosidade de superfície de discos de titânio sobre a proliferação e diferenciação de células de medula óssea humana*. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

Silva Júnior NA. *Análise in vitro da proliferação e diferenciação de células da medula óssea humana, cultivadas sobre discos de titânio e irradiadas com laser terapêutico*. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

Suda M, Takayama K, Otsuka M. An accurate quantitative analysis of polymorphic content by chemometric X-ray powder diffraction. *Anal Sci* 2008,24(4):451-458.

Szmukler-Moncler S, Testori T, Bernard JP. Etched Implants: a comparative surface analysis of four implant systems. *J Biomed Mater Res* 2004, 69B:46-57.

Teixeira ER. In: Polido W, Dinato C. *Implantes Osseointegrados: Cirurgia e Prótese*. São Paulo: Artes Médicas, p.63-80, 2001.

Toney MF, Brennan S. Observation of the effect of refraction on x rays diffracted in a grazing-incidence asymmetric Bragg geometry. *Phys Rev* 1989,39(11):7963-7966.

Vitte C, Fleisch H, Guenther HL. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology* 1996;137:2324-33.

Watts N, Olszynski WP, McKeever CD, Grauer A, Chines A. Treatment discontinuation effects on bone turnover and BMD with risedronate. *Bone* 2004;S1:S99.

Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Impl Res* 2009, 20(4):172-184.

Wennerberg A, Albrektsson T. Oral Implants Surfaces: Part I – Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 2004;17:536-543.

Yoshimoto M, König B, Allegrini S, Carbonari MJ, Lopes CC, Adami N, Salles MB. Estudo comparativo da biocompatibilidade de implantes de titânio revestido de hidroxiapatita em coelhos (*Oryzomys cuniculus*). *Rev Bras Implantodont Prótese Implant* 2004;11(42):143-147.

Yoshinari M, Oda Y, Ueki H, Yokose S. Immobilization of bisphosphonates on surface modified titanium. *Biomaterials* 2001;22:709-715.

Yoshinari M, Oda Y, Inoue T, Matsuzaka K, Shimono M. Bone response to calcium phosphate-coated and bisphosphonate-immobilized titanium implants. *Biomaterials* 2002;23:2879-2885.

Zhu X, Chen J, Scheideler L, Reichl R, Geis-Gerstorfer J. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. *Biomaterials* 2004;25:4087-4103.

ANEXO 1



Comissão Científica e de Ética
Faculdade de Odontologia da PUCRS

Porto Alegre 11 de março de 2009

O Projeto de: Dissertação

Protocolado sob nº: 0106/08

Intitulado: Avaliação da adesão e proliferação osteoblástica na presença de bisfosfonatos imobilizados em superfície de titânio coberto com fosfato de cálcio

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Luciana Mayumi Hirakata

Pesquisadores Associados Magáli Beck Guimarães

Nível: Mestrado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 14 de janeiro de 2009.

Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS