



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
OPÇÃO IMPLANTODONTIA

CRESCIMENTO E ADESIVIDADE CELULAR A TRÊS TIPOS DE
SUPERFÍCIES DE IMPLANTES DE TITÂNIO c.p.

EDSON MAKOWIECKY

FLORIANÓPOLIS – SC
JUNHO DE 2000

EDSON MAKOWIECKY

**CRESCIMENTO E ADESIVIDADE CELULAR A TRÊS TIPOS DE
SUPERFÍCIES DE IMPLANTES DE TITÂNIO c.p.**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

**Projeto de Pesquisa apresentado ao Programa de Pós-
Graduação em Odontologia – Opção Implantodontia,
do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Santa Catarina.**

**FLORIANÓPOLIS – SC
JUNHO DE 2000**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	p. 6
2 OBJETIVOS	p. 8
2.1 Objetivo Geral	p. 8
2.2 Objetivos Específicos	p. 8
3 REVISÃO DA LITERATURA	p. 9
4 MATERIAIS E MÉTODOS	p. 13
5 CRONOGRAMA	p. 16
6 ORÇAMENTO	p. 17
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	p. 18

**CRESCIMENTO E ADESIVIDADE CELULAR A TRÊS TIPOS DE
SUPERFÍCIES DE IMPLANTES DE TITÂNIO C.P.**

1 INTRODUÇÃO

O objeto de pesquisa centra-se no estudo dos implantes dentários e no aperfeiçoamento da ciência nesta área de conhecimento.

O implante dentário tem sido largamente estudado por vários autores e pesquisadores da área odontológica, devido à sua importância na reabilitação oral de pacientes edêntulos parciais ou totais.

Os cilindros de titânio são empregados em substituição as raízes dentárias, que após um período de espera e ocorrida a osseointegração, próteses são confeccionadas e instaladas visando uma recuperação estética e funcional destes pacientes.

Os implantes endósseos permitem uma reabilitação bucal sem desgastes dentários, o que se revela uma grande vantagem sobre as próteses fixas convencionais.

Ao realizarmos uma implantação com cilindro de titânio, o que se espera e deseja é um maior contato possível de células especializadas na superfície do metal que promovam uma osseointegração – contato direto osso-implante.

O titânio é usado tanto na forma pura (99,75% puro) c.p. (comercialmente puro) e como em liga Ti-6Al-4V (Ti – 90%, Al – 6%, V – 4%). Basicamente, o titânio é um metal não-nobre, protegido por uma camada passiva de Dióxido de Titânio que se forma espontaneamente no ar ou na água.

SPIKERMANN (2000) referiu-se a essa camada como sendo biologicamente inerte, cuja espessura cresce 10Å em milésimos de segundos, pode aumentar para 100Å dentro de um minuto. Pode alcançar 2000Å após longos períodos de tempo.

Segundo McQUEEN et al (1982), podem alcançar 2000Å depois de 6 anos ‘in situ’ sob condições normais clínicas. Se a camada de óxido for danificada, ela se regenera em segundos. Quimicamente, a camada de óxido consiste de vários óxidos (TiO₂, TiO, Ti₂O₃), mas o TiO₂ parece predominar.

ALBREKTSSON et al (1981 e 1984), HANSSON, ALBREKTSSON, BRANEMARK (1983), através de pesquisas histológicas demonstram a excelente incorporação dos implantes de titânio e o íntimo contato entre a superfície do titânio e o osso perimplantar. Por essa razão, a interface Titânio-Osso pode transferir com sucesso forças compressiva e de cisalhamento impostas na cavidade bucal, mas somente se a configuração do implante proporcionar retenção mecânica. A degradação do titânio 'in vivo' é mínima devido à camada protetora de óxido.

ALBREKTSSON et al (1981), propuseram que o contato celular pode ser dependente da superfície do implante. Os autores afirmam que há numerosas maneiras experimentais de alterar a superfície do metal e conseqüentemente, aumentar a capacidade de ligação ao osso.

Na confecção do implante é imperativo que além da biocompatibilidade do material, tamanho e forma (Topografia), seja considerada a microestrutura de sua superfície (Textura Superficial).

Sabe-se que, uma das mais importantes condições limítrofes, para o sucesso ou fracasso de implante, é promovida pelas propriedades de sua superfície (manufatura, métodos de esterilização, limpeza e contaminantes), durante as quais poderão ocorrer mudanças na energia de superfície crítica com relação a bioadesividade.

Em síntese, justifica-se a realização deste trabalho, em procurar o melhor tipo de superfície para um sistema de implantes endósseos, considerando sua macro e microestrutura.

Macroscopicamente, sabemos que o implante com superfície rosqueável oferece uma melhor retenção em função de sua maior superfície de contato com o tecido ósseo.

Microscopicamente, dentre os três tipos de tratamento de superfície citados, esperamos um melhor crescimento e adesividade celular na superfície jateada com esferas de vidro. Isto certamente definirá sua escolha para o novo sistema de implantes de titânio c.p.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Definir o melhor tipo de superfície para um sistema de implantes endosseos que está sendo desenvolvido pelo CEPID (Centro de Estudo de Pesquisa em Implantes Dentários) e o Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), através da cultura de fibroblastos e osteoblastos.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar o comportamento celular. Crescimento de fibroblastos e osteoblastos em três tipos de superfície de implantes de titânio c.p. (superfície lisa, jateada, rosqueável).
- Analisar a adesividade das células citadas acima aos três tipos de superfície de titânio c.p.
- Comparar o comportamento celular (crescimento e adesividade) dos fibroblastos e dos osteoblastos aos três tipos de superfície.

3 REVISÃO DA LITERATURA

É sabido que a topografia da superfície é capaz de modificar o comportamento celular, mas infelizmente a literatura não tem dado a devida atenção sobre a possibilidade da superfície do implante promover respostas desejáveis nas células e tecidos que entram em contato com o metal.

Existem três tipos distintos de tecidos (epitélio, conjuntivo gengival, osso) envolvidos nos implantes osseointegrados, o que torna bastante complexa a inserção de células nos mesmos.

O Internation Team for Implantology, do Instituto Straumann, desenvolveu um sistema de implante, de um estágio, com uma superfície de plasma de titânio pulverizado. BABBUSH, KENT, MISIEK (1986), descreveu o sistema detalhadamente. A cobertura com plasma de titânio pulverizado promove um contato ósseo direto (osteointegração). Esta cobertura aumentou a área de superfície de 200 mm² para 1.200 mm², portanto maximizou a área de contato em 6 vezes, resultando em uma excelente estabilização primária e boa distribuição de forças.

SPIKERMANN (2000) corrobora ao que foi dito acima, estimando que este processo leve a um aumento de 6 a 10 vezes da área de superfície do corpo do implante. Ainda descreve a técnica de revestimento com plasma “spray” de titânio. Ela envolve forçar um gás nobre que é dividido em íons e elétrons (plasma), por meio de um arco intensamente aquecido (15.000 – 20.000 °C) e uma velocidade muito alta (3.000 m/s). o material de revestimento (partículas de pó de titânio na forma de Hidreto de Titânio) é colocado no “spray” de gás extremamente quente usando argônio. O hidreto se decompõe no vapor do gás quente e pequenas gotículas de metal são projetadas no corpo do implante que está a uma distância de 15 – 20 cm. As partículas de titânio exibem o tamanho de 5-100 µm soldam-se firmemente ao corpo do implante por essa técnica de “spray” de plasma. A camada resultante apresenta uma espessura de aproximadamente 30-50 µm. Ela consiste de uma série de formas arredondadas e interconectadas e é extremamente porosa.

Vários sistemas de implantes têm incorporado textura, rugosidade ou poros nas suas superfícies, buscando assim uma maior área de contato (superfície) que promova um maior potencial para a inserção celular, e o crescimento tecidual no interior destas irregularidades para estabilizar mecanicamente o implante.

THOMAS & COOK (1985), estudando implantes com vários módulos de elasticidade fabricados de óxido de alumínio, carbono e polimetilmetacrilto, relataram que aposição óssea direta à superfície do implante foi muito maior nas superfícies rugosas do que nas lisas.

Superfícies lisas e rugosas foram colocadas em meios de culturas por RICH & HARRIS (1981). Os fibroblastos acumularam-se mais ao redor das superfícies lisas, enquanto os macrófagos preferiram as superfícies rugosas. A este fenômeno os autores chamaram de “rugofilia”. Esta tendência de células da linhagem dos monócitos serem atraídas para as superfícies rugosas é preocupante, pois sabemos que os osteoclastos são derivados destas células.

Segundo BRUNETTE (1988) as superfícies podem afetar diretamente a forma e a função celular. As células crescem com maior intensidade ao redor de substratos rugosos do que nos lisos. O número, crescimento, secreção de proteinases e expressão fenotípica são afetados pelo formato celular. Portanto, a topografia da superfície de um implante possui o potencial de selecionar certas populações celulares em detrimento de outras.

CARTER (1981), sugeriu o termo “Haptotaxia” para descrever a direção do movimento celular que ocorre com resultado de gradientes do substrato. As células em um gradiente adesivo se movem em direção do aumento de aderência, ou seja, em direção a concentração mais alta do adesivo.

A haptotaxia, provavelmente desempenha um papel no comportamento celular da interface tecido-implante. Células, ‘in vivo’, aderem-se umas as outras e à matriz extracelular. A colocação de um implante produz um possível gradiente adesivo. É esperado que células se acumulem e se adiram ao implante, quando o material for mais adesivo do que as outras células ou a matriz extracelular. Contrariamente, espera-se que as células prefiram se aderir

entre si ou a matriz extracelular, quando o material possuir uma baixa energia superficial. Esta situação, freqüentemente, resulta na formação de cápsula fibrosa.

A orientação por contato refere-se a tendência das células se locomoverem em uma determinada direção em função da forma do substrato, por exemplo, culturas de fibroblastos adquirem orientação paralela as ranhuras superficiais.

WEISS apud RICH & HARRIS (1981) foi o pioneiro em investigar um outro fenômeno que parece ocorrer nas interações célula-implante: “o efeito dois-centro”. Uma ponte celular é formada, ‘in vitro’, com um disco agindo como um centro e a parede do recipiente da cultura celular como o outro. Sugere ainda, que macromoléculas do exsudato celular ficam orientadas paralelamente ao longo eixo das ranhuras da superfície dos implantes, e estas moléculas orientam a locomoção das células sobre o metal.

Os vários fenômenos de comportamento celular que foram abordados; primeiramente, ‘in vitro’, incluindo a orientação por contato, rugofilia, efeito dois-centro e haptotaxia, parecem também possíveis de ocorrência ‘in vivo’.

A orientação por contato alinha as células e fibras colágenas com as pequenas ranhuras que foram produzidas na manufatura do implante. A rugofilia descreve a tendência de macrófagos preferirem as superfícies rugosas. O efeito dois-centro pode explicar a orientação das células do tecido conjuntivo gengival e das fibras inseridas aos poros da superfície. A haptotaxia pode ser envolvida na formação de cápsulas ao redor dos implantes com baixa energia de superfície.

MICHAELS et al (1989), avaliaram a aderência celular sobre superfície de titânio com vários graus de rugosidade, preparados do seguinte modo: polidas com pasta diamantada de 1mm (superfícies lisas) e lixadas com papel de sílica com granulação 600 ou jateados com esfera de vidro (superfícies rugosas). As amostras foram limpas em solvente, lavadas, passivadas e enxaguadas em água deionizada. Posteriormente foram incubadas, por mais de 2 horas em meio apropriado com fibroblastos de ligamento periodontal humano ou osteoblastos de calvária de ratos. Os autores concluíram que células diferentes apresentaram respostas variadas à rugosidade superficial, e esta, portanto, pode influenciar a resposta ao implante.

KELLER, GROTENDORST, DOUGHERTY (1989), avaliaram a aderência celular sobre o titânio c.p.. Discos de titânio c.p. foram polidos com papel metalográfico ou pasta diamantada. Em seguida, os discos foram limpos em solventes, lavados e passivados em ácido nítrico a 30% e novamente lavados em água destilada. E então esterilizados em 3 diferentes maneiras: autoclave, óxido de etileno ou imersão em álcool etílico a 100%. Fibroblastos humanos foram encubados por mais de uma hora. O número de células que não aderiram foi quantificado e a porcentagem de células aderidas foi então calculada. Como de controle, foram usados plásticos tratados para cultura e aderência celular. A aderência celular foi mais baixa nas superfícies esterilizadas em óxido de etileno (76%), contudo, não foi significativamente distinta daquelas nas superfícies esterilizadas em autoclave (82%) ou álcool etílico (75%). Segundo os autores, os procedimentos de esterilização têm potencial para afetar a resposta biológica dos implantes.

“BOWERS et al (1992) apud MAGINI (1997), investigaram a influência das rugosidades de superfície do titânio na aderência de células osteoblásticas. Discos de titânio c.p. foram preparados para produzir dois tipos de superfície: regular e irregular. As superfícies irregulares foram polidas com papel metalográfico de granulação 600 seguidas de jateamento com óxido de alumínio com partículas de 50 μm ou condicionadas pelo ataque ácido com 3,5% de HF, 25% de HNO_3 por 1,5 a 10 minutos. As superfícies com morfologia regular foram produzidas pela aplicação de papel metalográfico de granulação 60 ou 120. O grupo controle foi polido com papel de granulação 600 para realizar a medida da rugosidade no perfilômetro. Todas as amostras foram limpas em solventes lavadas em água destilada, passivadas com ácido nítrico, lavagem final com água destilada, secas a vácuo e esterilizadas pelo uso do perfilômetro para determinar a rugosidade superficial pelo meio de cultura com as células de calvária de ratos para verificar a adesão celular e pela microscopia eletrônica de varredura para analisar as características morfológicas das células em relação aos diferentes tipos de superfície e intervalos de tempo. Os resultados sugeriram que o tipo de rugosidade da superfície de titânio c.p. modifica a resposta biológica inicial e a aderência celular. A superfície com morfologia irregular produzida pelo jateamento pareceu ser mais atrativa para a aderência celular do que a superfície rugosa produzida pelo polimento com papel metalográfico ou pelo condicionamento ácido”.

“BAIER et al (1982) demonstraram os efeitos degradativos da esterilização convencional original no metal de titânio por produzir uma camada superficial espessa e por diminuir a energia de superfície. Os autores demonstraram que a esterilização por descarga incandescente por frequência de rádio, por 3 a 5 minutos, produziu uma energia de superfície extremamente alta com o mínimo de contaminantes em amostras com superfícies lisas. Neste trabalho, foi investigada a formação de uma película biológica e sua influência na bioadesão. Os autores concluíram que as qualidades da superfície do material do implante são essencialmente críticas na determinação da configuração assimilada dos biofilmes mais precoces”.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Um teste piloto definirá as dimensões e o número de medidas em cada corpo de prova de titânio puro (99,75%).

Teremos no total 48 corpos de prova com 3 (três) tipos de superfícies, quais sejam:

1. 16 com superfície lisa-polida
2. 16 com superfície lisa jateada com esfera de vidro
3. 16 com superfície em rosca (rosqueável)

Obs.: O Departamento de Engenharia de Biomateriais da UFSC não dispõe de tecnologia para um bom padrão de rugosidade nas superfícies rosqueáveis do titânio, mas consegue produzi-las nas superfícies lisas do mesmo.

Todos os corpos de prova serão usinados com titânio grau I, com composição química controlada. O tratamento superficial será realizado, seguindo o protocolo descrito abaixo:

1. Lavagem com Tricloroetileno por 10 minutos em ultra-som;
2. Lavagem em Álcool absoluto por 10 minutos em ultra-som;
3. Lavagem em Álcool absoluto por 10 minutos em ultra-som;
4. Remoção das rebarbas de usinagem (utilizando uma lupa com aumento máximo de 40 vezes)
5. Jato com esfera de vidro;
6. Lavagem com Tricloroetileno por 10 minutos em ultra-som;
7. Lavagem com Álcool absoluto por 10 minutos em ultra-som;
8. Lavagem com Álcool absoluto por 10 minutos em ultra-som;
9. Imersão em ácido sulfúrico 10% por 10 minutos em ultra-som;

10. Três lavagens com água deionizada e bidestilada;
11. Lavagem com Tricloroetileno por 10 minutos em ultra-som;
12. Lavagem com Álcool absoluto por 10 minutos em ultra-som;
13. Lavagem com Álcool absoluto por 10 minutos em ultra-som;
14. Secagem ao ar;
15. Passivação em estufa a 180°C por 30 minutos;
16. Colocação dos implantes em ampolas de vidro contendo Lauril a 2% ou Álcool Etilico a 10%;
17. Esterilização em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Os doadores de tecidos ósseo e conjuntivo gengival para as culturas ainda não foram definidos, podendo ser humanos, ratos, coelhos, cães ou macacos. Porém a coleta será nas dependências da Universidade Federal de Santa Catarina.

Este material coletado será imediatamente acondicionado em recipiente contendo o meio de cultura nutriente HAM F-10 (1 ml) + Soro Fisiológico 0,9% (1 ml) + Solução Antibiótica de Penicilina/Estreptomicina (0,5 ml), para transporte até o Laboratório e Clínica Médica Neurogêne. Esta presta assessoria na área de biologia celular e adequadamente estruturado, contendo estufa 37°, microscópio ótico e fluxo laminar para desenvolvimento das culturas e posterior análise do crescimento/inserções celulares.

Assim sendo, no laboratório ele será preparado (dissecado) e incluído em 56 tubos FALCON estéreis, marca SARSTED, com meio de cultura, acima citado, assim distribuídos:

- 8 com corpo de prova (titânio) superfície lisa – cultura de tecido conjuntivo gengival (fibroblastos);
- 8 com corpo de prova (titânio) superfície lisa – cultura de tecido ósseo (osteoblastos);

- 8 com corpo de prova (titânio) superfície jateada – cultura de tecido conjuntivo gengival (fibroblastos);
- 8 com corpo de prova (titânio) superfície jateada – cultura de tecido ósseo (osteoblastos);
- 8 com corpo de prova (titânio) superfície rosqueável – cultura de tecido conjuntivo gengival (fibroblastos);
- 8 com corpo de prova (titânio) superfície rosqueável – cultura de tecido ósseo (osteoblastos);
- 4 tubos FALCON (controle) com cultura de tecido conjuntivo gengival (fibroblastos);
- 4 tubos FALCON (controle) com cultura de tecido ósseo (osteoblastos).

O material necessário para o desenvolvimento de culturas será adquirido junto a PEDEMED ou LABTRADE distribuidoras da Empresa CultiLab – Materiais para Cultura de Células Ltda.

Passado o período de observação (aproximadamente 30 dias) para o crescimento e inserções celulares no titânio, parte-se para a leitura dos resultados, ou seja, uma análise quantitativa, em termos de medições, em princípio, 5 (cinco) em cada corpo de prova. Estas medições serão realizadas em locais fixos, pré-estabelecidos, visando leitura mais fácil e real dos resultados obtidos.

Para aferição dos resultados, os dados serão analisados utilizando-se teste estatístico de análise de variância (ANOVA), acrescido de estatística descritiva para comparar o número de inserções de fibroblastos e osteoblastos em cada grupo

6 ORÇAMENTO

MATERIAL	VALOR*
Papel A4	R\$ 50,00
Disquete computador	R\$ 50,00
Cartucho para impressora	R\$ 100,00
Mão de obra do laboratório Neurogene (56 culturas)	R\$1.680,00
Tubos FALCON (56)	R\$ 280,00
Meios de cultura (56)	R\$ 190,00
Penicilina / Estreptomicina	R\$ 240,00
Soro fetal bovino	R\$ 420,00
3 caixas agulhas descartáveis BD-25x7	R\$ 6,00
3 caixas seringas descartáveis (10ml)	R\$ 35,00
3 caixas de lâminas de bisturi – nº 24	R\$ 28,00
1 caixa de seringa de insulina	R\$ 75,00
2 litros de tricloroetileno	R\$ 28,00
2 litros de álcool absoluto	R\$ 11,00
2 litros de ácido sulfúrico 10%	R\$ 24,00
2 litros de água deionizada destilada	R\$ 28,00
2 litros de álcool etílico 10%	R\$ 4,00
TOTAL	R\$ 3.249,00

* Levantamento executado em junho/2000.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALBREKTSSON, T. The response of bone to titanium implants. **Crit. Rev. Biocompat.**, Buffalo, New York, v.1, n.53, p.123-34, Jul 1984.
- 2 ALBREKTSSON, T. The response of bone to titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone anchorage in man. **Acta Orthop. Scand.**, Roseville, Califórnia, v.52, n.7, p.155-70, Oct 1981.
- 3 BABBUSCH, C.A., KENT, J.N., MISIEK, D.J. Titanium plasma sprayed (TPS) screw implants for the reconstruction of the edentulous mandible. **J. Oral. Max.-Fac. Surg.**, Lombard, Illinois, v.44, n.274, p.275-96, Mai 1986.
- 4 BAIER, R.E., et al. Degradative effects of convetional steam sterilization on biomaterial surfaces. **Biomaterials**, Buffalo, New ork, v.3, p.241-45, Sep 1982
- 5 BOWERS, K.T. et al. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Bruxelas, Bélgica, v.7, n.3, p.302-10, Jun 1992.
- 6 BRUNETTE, D.M. The effects of implant surface topography on the behavior of cells. **Int. J. Oral Mexillofac. Implants**, Viena, Austria, v.3, n.2, p.231-46, Ar 1988.
- 7 CARTER, J.M. et al. Organic surface film contamination of vitallium implants. **J. Biomed. Mater. Res.**, Vancouver, Canadá, v.15, n.7, p.843-51, Jan 1981.
- 8 HANSSON, H.A., ALBREKTSSON, R., BRAMEMARK, P.I. Structural aspectos of the interface between tissue and titanium implants. **J. Prosth. J. Plast. Reconstr. Surg.**, Knoxville, Tennessee, v.50, n.108, p.576-98, Oct 1983.
- 9 KELLER, P.C., GROTENDORST, G.R., DOUGHERTY, W.J. Cell attachment to sterilized ti c.p. surfaces. **J. Dent. Res.**, Western, Austrália, v.28, p.115-133, Dec 1989.
- 10 MAGINI, R. de S. **Análise comparativa do comportamento de implantes de Ti c.p. com diferentes meios de armazenagem. Análise microscópica e torque de remoção.** Bauru, 1997, 204p. Tese (Doutorado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, 1997.

- 11 McQUEEN et al. Auger electron spectroscopic studies of titanium implants. In: LEE, A., ALBREKTSSON, T., BRANEMARK, P.I. **Clinical Applications for Biomaterials**. London, Wiley, 1982. 244p., p.179-185.
- 12 MICHAELS et al. In vitro connective tissue cell attachment to c.p. ti. **J. Dent. Res.**, Gotemburgo, Suécia, v.68, n.758, p.276, Feb 1989. Abstract n° 759.
- 13 RICH, A., HARRIS, A.K. Anamolous preferences of cultered macrophaces for hidrophobic and roughened substrata. **J. Cell. Sci.**, Umea, Sweden, v.50, n.1, p.1-7, Mar/1981.
- 14 SPIEKERMANN, H. **Implantologia**. . Porto Alegre: Artmed., 2000, p.11-24, 388p.
- 15 THOMAS, K.A., COOK, S.D. A nevaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. **J. Biomed. Mater. Res.**, Toronto, Canadá, v.19, n.2, p.875-901, Nov/1985.