

EDSON MAKOWIECKY

**PROPOSTA PROTOCOLAR PARA AVALIAR *IN VITRO* O
CRESCIMENTO E ADESÃO CELULARES FRENTE A IMPLANTES DE
TITÂNIO C.P. COM QUATRO TEXTURAS SUPERFICIAIS OBTIDAS
POR USINAGEM**

Florianópolis
2002

EDSON MAKOWIECKY

**PROPOSTA PROTOCOLAR PARA AVALIAR *IN VITRO* O CRESCIMENTO
E ADESÃO CELULARES FRENTE A IMPLANTES DE TITÂNIO C.P. COM
QUATRO TEXTURAS SUPERFICIAIS OBTIDAS POR USINAGEM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia – área de concentração: Implantodontia.

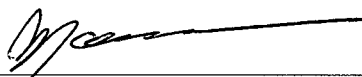
Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

Edson Makowiecky

**PROPOSTA PROTOCOLAR PARA AVALIAR *IN VITRO* O CRESCIMENTO
E ADESÃO CELULARES FRENTE A IMPLANTES DE TITÂNIO C.P. COM
QUATRO TEXTURAS SUPERFICIAIS OBTIDAS POR USINAGEM**

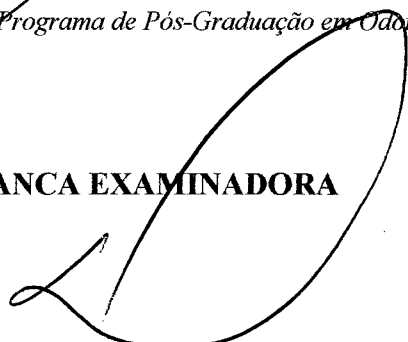
Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de MESTRE EM ODONTOLOGIA – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO IMPLANTODONTIA e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2002

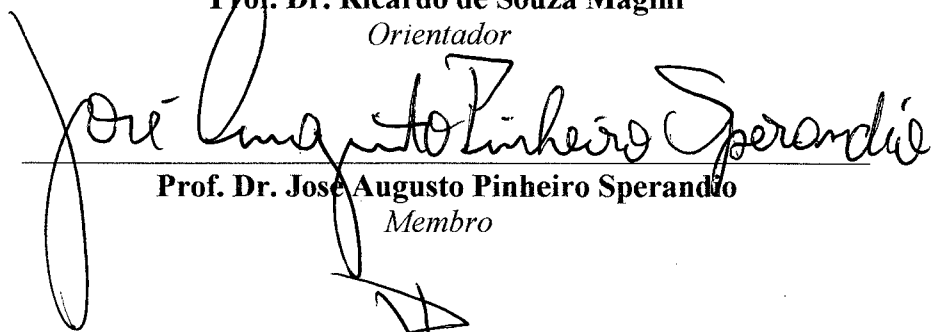


Prof. Dr. Mauro Amaral Caldeira de Andrada
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

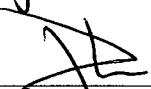
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Orientador



Prof. Dr. José Augusto Pinheiro Sperandio
Membro



Prof. Dr. Paulo Renato Corrêa Glavan
Membro

Dedico este trabalho à Leninha, minha querida esposa, sempre presente, segurando todas as pontas, possibilitando que eu me dedicasse exclusivamente ao mestrado, partilhando o “sabor das massas e das maçãs”, que enfrentou comigo e além de mim, tantos momentos da vida, alguns doces, outros nem tanto, com sua imprescindível leveza de ser.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ricardo de Souza Mangini. Professor do Departamento de Estomatologia, disciplina de Periodontia e Implantodontia da Universidade Federal de Santa Catarina, agradeço pela constante orientação, tanto deste trabalho quanto da coordenação do curso de mestrado, que me desafiou a ultrapassar limites.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Cardoso, que na Coordenação do Curso de Doutorado, também ajudou a tornar este projeto possível e aguçar meu senso crítico à odontologia como também pela excelente orientação quanto aos recursos fotográficos e audiovisuais.

Meus agradecimentos, também ao Prof. Dr. Lourival Boehs, ao ceder as instalações e equipamentos dos laboratórios da Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina para usinagem e análise quantitativa fossem viabilizadas.

Ao engenheiro mecânico, Fernando de Souza Pereira, pela válida colaboração e disponibilidade durante as etapas de confecção dos implantes a serem testados in vitro frente a cultura de células.

A Dra. Ingrid Tremel Barbato, agradeço o esclarecimento de dúvidas durante a realização deste trabalho.

À Profa. Liene Campos pela orientação na apresentação deste trabalho.

À Cleunisse Rauen Canto pela digitação deste trabalho.

A meu pai João, por me mostrar o valor da universidade e me prover do melhor estudo.

À minha mãe Maria da Glória, por me estimular nos estudos desde sempre, a começar pelas redações.

À minha esposa, Maria Helena, por tornar tudo possível.

Aos meus filhos Guilherme e Lívia, porque no fundo é para eles, os filhos, que fazemos tudo e porque tudo faz sentido.

Ao meu irmão Nelson, por dividir comigo uma vida profissional ligada à odontologia.

À Mira Petry, segunda mãe, pelo reconhecido valor que deu ao trabalho que ora encerro.

À minha irmã Sandra, por facilitar meu contato com as “soft sciences”, que de soft nada têm, e por facilitar meu contato com as palavras.

Ao meu irmão Norton, pelo auxílio no inglês e de quem recebi as mais magistrais orientações/traduições quanto a língua falhava.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade.

Aos colegas da disciplina Humberto, Paulo, Rubens, Nazareno, Graciela do curso de graduação em odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, por suprirem minha ausência nesse período.

As colegas de curso Cinthia, Adriane, Cláudia, Nilo, Bertholdo, Wilson, Omar, Bianchini pelo ambiente de amizade e convívio fraternal.

Aos Funcionários do CEPID, Pós-Graduação e Biblioteca Setorial – Odontologia pelo sempre pronto atendimento constante.

À DEUS, pela força e luz que aparecem quando preciso.

Meus agradecimentos sinceros a todos aqueles que direta ou indiretamente participaram na realização deste trabalho.

“Não nos esqueçamos: o ser jamais será redutível ao conhecimento. Somos sempre mais do que sabemos. A representação do mundo é infinitamente mais pobre do que a concretude de sua presença real, em cujo chão nos enraizamos para existir. O conhecimento científico do mundo nos desvenda, apenas, a ponta do iceberg. À semelhança deste, tem o mundo uma espessura oculta, que escapa à nossa possibilidade de exprimi-la.”

(PELEGRINO, 1995)

MAKOWIECKY, E. **Proposta protocolar para avaliar *in vitro* o crescimento e adesão celulares frente a implantes de Titânio c.p. com quatro texturas superficiais obtidas por usinagem.** 2002. 120f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Implantodontia). Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

A biocompatibilidade promove a oportunidade de investigar e comparar os resultados fenomenológicos gerados pelos estudos laboratoriais *in vitro*, investigações *in vivo*, em animais e, em humanos. Este trabalho situa-se entre estudos que visam beneficiar processos de osseointegração, fundamentais no desenvolvimento dos implantes, por meio de estudos *in vitro*. Trata-se da proposta de um protocolo para avaliar *in vitro*, em culturas de células osteoprogenitoras e células osteoblásticas provenientes de maxilares humanos, o crescimento e adesão celulares frente à quatro diferentes rugosidades obtidas por usinagem na superfície de amostras de cilindro de titânio c.p. seccionados.

Palavras-chave: Implante dental, Cultura de Células osteoblástica; Osseointegração.

MAKOWIECKY, E. **Proposta protocolar para avaliar *in vitro* o crescimento e adesão celulares frente a implantes de Titânio c.p. com quatro texturas superficiais obtidas por usinagem.** 2002. 120f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Implantodontia). Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

Bio-compatibility gives the opportunity to investigate and compare phenomenological results generated in laboratory studies, such as *in vitro* tests and *in vivo* investigations performed in animals and in human beings. The intention of this study is to benefit osseointegration processes, which are fundamental in the development of implants, through *in vitro* investigations. It is a proposal of an *in vitro* evaluation of osteoprogenitory and osteoblastic cells of human maxillaries and their growth and adherence capacity in samples of sectioned titanium cylinders with four different manufactured surface roughnesses.

Keywords: Dental implants, Cell culture osteoblastic, Osseointegration.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO | p.7 |
| ABSTRACT | p.8 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS | p.11 |
| LISTA DE FIGURAS | p.13 |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | p.14 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | p.18 |
| 2.1 Titânio | p.18 |
| 2.1.1 Biocompatibilidade-Osseointegração | p.18 |
| 2.1.2 Contaminação metálica | p.19 |
| 2.1.3 Energia de superfície e esterilização | p.20 |
| 2.1.4 Passivação | p.22 |
| 2.2 Tratamento de superfície | p.27 |
| 2.3 Resposta biológica tecidual e celular | p.40 |
| 3. PROPOSIÇÃO | p.58 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | p.59 |
| 4.1 Obtenção do implantes | p.59 |
| 4.1.1 Titânio | p.59 |
| 4.1.2 Equipamento para fabricação dos implantes | p.59 |
| 4.1.3 Ferramentas utilizadas no torno com comando numérico | p.59 |
| 4.1.4 Amostras para o estudo experimental | p.60 |
| 4.1.5 Equipamento para mensuração da rugosidade de superfície do implante | p.61 |
| 4.1.6 Seleção e determinação dos grupos experimentais | p.62 |
| 4.1.7 Fabricação dos implantes - Usinagem | p.63 |
| 4.1.8 Parâmetros de rugosidade | p.64 |
| 4.1.9 Análise estatística | p.64 |
| 4.1.10 Resultados | p.64 |

| | |
|---|--------------|
| 4.2 Proposta protocolar para avaliar <i>in vitro</i> o crescimento e adesão celulares frente a implantes de Ti c.p. com quatro texturas superficiais, obtidas por usinagem | p.65 |
| 4.2.1 Limpeza e remoção de contaminantes dos implantes..... | p.65 |
| 4.2.2 Doadores de tecido ósseo córtico-trabecular para obtenção de células osteoprogenitoras e osteoblásticas..... | p.66 |
| 4.2.2.1 Obtenção de linhagem de células osteoprogenitoras e osteoblásticas. Procedimentos laboratoriais para isolamento e cultivo. | p.67 |
| 4.2.2.2 Observação do crescimento celular | p.70 |
| 4.2.2.3 Indução do fenótipo osteoblástico | p.72 |
| 4.2.2.4 Curva de crescimento celular..... | p.75 |
| 4.2.2.5 Observação com contraste de fase invertida..... | p.76 |
| 5 RESULTADOS | p.79 |
| 6 DISCUSSÃO..... | p.81 |
| 7 CONCLUSÕES..... | p.110 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | p.111 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------------------------------|---|
| ADA | American Dental Association |
| ASTM | American Society for Testing and Materials |
| Å | Angstrom |
| TiO ₂ | Dióxido de Titânio |
| Ti c.p. | Titânio comercialmente puro |
| TiO | Óxido de titânio |
| Ti ₂ O ₃ | Trióxido de titânio |
| Ti ₃ O ₄ | Tetraóxido de titânio |
| nm | Nanômetro |
| HF | Ácido fluorídrico |
| H ₂ NO ₃ | Ácido nítrico |
| Hcl | Ácido clorídrico |
| H ₂ SO ₄ | Ácido sulfúrico |
| HclO ₄ | Ácido perclórico |
| HÁ | Hidroxiapatita |
| µm | Micrômetro |
| µ | Microns |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| SEM | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| TEM | Microscopia Eletrônica de Transmissão |
| XPS ou ESCA | Eletroscopia por Emissão de Raio-X |
| EDS | Espectroscopia com Emissão de Raio-X e Dispersão |
| V | Vanádio |
| Al | Alumínio |
| Al ₂ O ₃ | Óxido de Alumínio |
| EAS | Espetroscopia Eletrônica de Auger |
| ZNO ₂ | Óxido de Zinco |
| LASER | Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation |
| Fe | Ferro |
| % | Porcentagem, por cento |
| Ncm | Newton por centímetro |
| ml | Mililitro |
| Cm ² /ml | Centímetro quadrado por mililitro |
| °C | Graus centígrado |
| °F | Graus Farhenait |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino Tetracético |
| HNO ₃ | Ácido nítrico |
| H ₂ O | Água |
| O ₂ | Oxigênio |
| OH ⁻ | Hidroxila |
| psi | Atmosferas de pressão |

| | |
|-----------------------------------|--|
| Nm | Newton por metro |
| MHZ | Mega Hertz |
| C | Carbono |
| Ca | Cálcio |
| B | Boro |
| Na | Sódio |
| Pb | Chumbo |
| H ₃ PO ₄ | Ácido Fosfórico |
| O | Oxigênio |
| N | Nitrogênio |
| m/s | Metros por segundo |
| mm | Milímetro |
| N/mm | Newton por milímetro |
| Hg | Mercúrio |
| h | Hora |
| Ti | Titânio |
| Nb | Nióbio |
| R _a | Rugosidade média aritmética |
| R _t | Maior profundidade de rugosidade |
| R _z (R _{1m}) | Média de 5 valores consecutivos. Picos-Vale |
| 2D | Bidimensional |
| S _α | Desvio padrão aritmético da rugosidade |
| S _q | Desvio médio quadrático de rugosidade |
| 3D | Tridimensional |
| S _{ma} | Parâmetro horizontal bidimensional |
| S _{en} | Parâmetro horizontal tridimensional |
| S _{tr} | Parâmetro horizontal tridimensional |
| S _{Λq} | Valor médio quadrático do declive do perfil |
| S _{dr} | Razão de área superficial |
| Δq | Valor médio quadrático do declive do perfil |
| Rz | Profundidade média de rugosidade |
| Rε | Raio de quina |
| C _{3a} | Complemento 3a |
| C _{5a} | Complemento 5a |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| DNA | Ácido desoxiribonucleico |
| Vc | Velocidade de corte |
| F | Avanço da ferramenta |
| CO ₂ | Gás Carbonico |
| PBS | Solução salina de fosfato (solução tampão) – Controle PH do meio |
| U/ml | Unidades por mililitro |
| M | Mol |
| DME | Meio Eagle modificado por Dulbecco |
| DME | Meio Eagle modificado por Dulbecco (médio) |
| Ug/ml | Microgramas por mililitro |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|------|
| Figura 1 – Amostra do implante do Grupo I ($f = 0,05\text{mm}$)..... | p.61 |
| Figura 2 – Amostra do implante do Grupo II ($f = 0,1\text{mm}$)..... | p.61 |
| Figura 3 – Amostra do implante do Grupo III ($f = 0,13\text{mm}$)..... | p.62 |
| Figura 4 – Amostra do implante do Grupo IV ($f = 0,15\text{mm}$)..... | p.62 |
| Figura 5 – Trefinas para remoção óssea dos maxilares | p.66 |
| Figura 6 – Recipiente de vidro para armazenagem do tecido ósseo maxilar no meio de Cultura nutriente | p.67 |
| Figura 7 – Triturador ósseo (R. Quetin) | p.68 |
| Figura 8 – Materiais utilizados para isolamento e cultivo celular | p.68 |
| Figura 9A, 9B, 9C, 9D, 9E – Materiais utilizados para isolamento e cultivo celular..... | p.69 |
| Figura 10A, 10B - Sub-cultura de células obtidas a partir da dispersão enzimática de células da calvária de ratos recém-nascidos no experimento de Deboni; Jaeger; Araújo (1996) | p.70 |
| Figura 10C, 10D – Sub-cultura de células obtidas a partir da dispersão enzimática de células da calvária de ratos recém-nascidos no experimento de Deboni; Jaeger; Araújo (1996) | p.71 |
| Figura 11A, 11B, 11C – Materiais utilizados para isolamento e cultivo celular..... | p.72 |
| Figura 11D – Materiais utilizados para isolamento e cultivo celular | p.73 |
| Figura 11E – Cilindros de Titânio seccionados estéreis colocados na sub-cultura de células osteoblásticas confluentes (16° ao 22° HA) | p.74 |
| Figura 12A – Sub-cultura de células obtidas a partir da dispersão enzimática de células da calvária de ratos recém-nascidos no experimento de Deboni; Jaeger; Araújo (1996)..... | p.74 |
| Figura 12B - Sub-cultura de células obtidas a partir da dispersão enzimática de células da calvária de ratos recém-nascidos no experimento de Deboni; Jaeger; Araújo (1996)..... | p.75 |
| Figura 13A, 13B – Discos de titânio em sub-cultura de células obtidas a partir da dispersão enzimática de células da calvária de fetos humanos de 6 meses de idade, após aborto legal..... | p.78 |
| Figura 14A, 14B - Discos de titânio em sub-cultura de células obtidas a partir da dispersão enzimática de células da calvária de fetos humanos de 6 meses de idade, após aborto legal..... | p.78 |

1. INTRODUÇÃO

A perda de elementais dentais implica na diminuição das funções mastigatórias, fonética e estética dos pacientes. Uma das formas de compensar a perda dos dentes pode ser através de próteses convencionais parciais ou totais. Porém, em condições locais desfavoráveis, como uma pronunciada reabsorção alveolar, a não aceitação do paciente e o desconforto causado pela prótese (principalmente removíveis), próteses retidas por implantes têm sido uma das alternativas às próteses convencionais.

Ao estudar o desenvolvimento da implantodontia, verifica-se que diferentes materiais, projetos de implantes e técnicas de tratamento foram pesquisados levando a resultados diversos desde a utilização das muitas modalidades de terapia com os implantes cilíndricos integrado, subperióstico, em armação de ramo, em lâmina, de inserção transmucosa e endósseos.

O sucesso ou o fracasso na osseointegração é dependente do controle de seis parâmetros, quais sejam, biocompatibilidade do material utilizado, estado do sítio receptor, técnica cirúrgica, condições de carga e macroestrutura e microestrutura do implante (ALBREKTSSON et al., 1981).

Linder et al (1983) ao analisarem a interface osso-titânio, sob MEV, afirmaram que um implante não tem que ser poroso, com forma de parafuso ou superfície rugosa para tornar-se osseointegrado, nem tem que estar coberto com substâncias que atraiam o osso. A macroestrutura do implante tem pouca influência sobre a resposta tecidual, contudo, em situação clínica, pode ser vantajoso escolher um implante com um desenho superficial que garanta a estabilidade durante o período de cicatrização, um dos determinantes para o sucesso da osseointegração. Conforme estes autores a interação tecido-superfície é mais dinâmica do que estável. Ela passará por estágios com o passar do tempo, especialmente durante o período inicial após a implantação e será influenciada pelas propriedades da superfície original do implante. Nos primeiros segundos após a implantação, existirá essencialmente água, íons

dissolvidos e biomoléculas livres muito próximas à superfície, sem a presença de células. A composição do biolíquido mudará continuamente com o passar do tempo durante o processo inflamatório e de cicatrização. Ocorrerá mudanças na composição e no leito de biomoléculas absorvidas sobre a superfície do implante. Eventualmente ocorre aproximação de células e tecido na superfície do implante. Dependendo da natureza do leito absorvente, as células responderão de maneira específica, o que pode modificar o leito absorvato de biomoléculas. Os tipos celulares próximas à superfície e suas atividades poderão variar com o passar do tempo e dependendo do tipo de interação inicial, o resultado final pode ser a integração óssea ou a formação de uma cápsula fibrosa.

Na década de 80 novos e modificados materiais foram introduzidos, especialmente desenhados e fabricados para antecipar respostas teciduais da interface implante-tecido ósseo resultando em biomateriais que apresentam propriedades anisotrópicas (MAGINI, 1997).

Entretanto, foi possível aumentar a capacidade de osseointegração (ancoragem do osso) com o uso de superfícies rugosas, texturizadas e com cobertura de fosfato de cálcio ou hidroxiapatita (BABBUSH, 1986). Isto ficou evidenciado por estudos histomorfométricos e biomecânicos que mostraram aumento significativo nas porcentagens de contato osso-implante e remoção por torque (ALBREKTSSON; SENNERBY, 1991).

Resultados de experimentos em animais e observações clínicas realizadas nas variadas instituições de todo mundo resultam em confiabilidade e aceitação dos tratamentos com implantes endósseos dentais e maxilofaciais, pois quando bem indicados e executados, representam importante técnica de reabilitação bucal com capacidade de recuperar funcional e esteticamente o paciente. Estes, são utilizados atualmente para substituir dentes perdidos, reconstruir o esqueleto crânio-facial, dar ancoragem durante tratamento ortodôntico e mesmo ajudar a formar novo osso no processo de distração osteogênica.

Verifica-se que a implantodontia em termos de osseointegração apresenta crescentes descobertas científicas e vem se consolidando através do estudo da biologia e engenharia tecidual. Inicialmente as pesquisas atuaram a nível macroscópico, posteriormente microscópico e mais recentemente sob uma ótica ultraestrutural. Entretanto, ainda hoje a osseointegração é foco de expectativas e especulações, pois materiais de implante atuais funcionam bem quando a qualidade óssea é boa e especialmente quando existe ancoragem bicortical, porém em regiões de osso esponjoso e fina lâmina cortical a resposta óssea não é

tão favorável. Por outro lado, biomateriais com diferentes composição química, aspereza de superfície e topografia provocam diferentes respostas biológicas por influenciarem o comportamento dos tecidos e das células, sendo esta resposta microscópica uma consequência de interações em nível molecular. Várias investigações na literatura indicam que um implante com superfície rugosa é capaz de estabelecer uma ligação bioquímica (contato ósseo) mais forte e mais cedo com os tecidos adjacentes, do que um implante similar com superfície lisa e polida (BUSER et al., 1991; PILLIAR et al. (1991); WENNERBERGER; ALBREKTSSON; LAUSMAA (1996); LARSSON et al. (1996); ELLINGSEN (1998); ORSINI et al. (2000). Provavelmente existem níveis ótimos de rugosidade de superfície para diferentes aplicações funcionais, porém, atualmente ainda não foi possível prever qual é a faixa de tamanho ideal para que isto ocorra.

Nos dias de hoje as superfícies rugosas são obtidas através de uma cobertura de Plasma Spray, por jateamento, ataque químico e associações do jateamento com ataque ácido. Dentre estes tratamentos superficiais, a superfície mais compatível com a osseointegração é aquela formada por pequenas rugosidades conseguidas através do jateamento ou tratamento químico, pois promovem um aumento de energia de superfície nos implantes.

Campos Jr.; Passanezi (1996) explicam que este aumento na energia de superfície facilita com que a H₂O, sangue e fluídos corporais se espalhem sobre as microirregularidades da superfície do implante influenciando positivamente o povoamento celular inicial, favorecendo assim o processo cicatricial inicial.

É de fundamental importância conhecer as reações que ocorrem no tecido, sobre a superfície do material e entre material e tecido depois da implantação. Muitas informações já são conhecidas, entretanto nos falta melhor entendimento da relação entre os eventos que ocorrem na superfície do implante e o efeito que certos materiais de implante tem nos tecidos. Estes conhecimentos possibilitarão projetar melhores implantes odontológicos no que diz respeito a osseointegração. O atual desafio da implantodontia é documentar qual a superfície, forma e composição do implante é melhor para tratar condições desfavoráveis e qual pode proporcionar longevidade de retenção celular, conforto e função para o paciente. Percebe-se que há um caminho muito longo a percorrer para se obter uma ancoragem ótima e permanente de próteses fixas sobre implantes nos maxilares.

A fim de suprir esta deficiência e frente ao interesse dos profissionais da odontologia que trabalham com implantes dentais, a indústria e os centros de pesquisa vem continuamente pesquisando materiais e formas de tratamento de superfície que tornem os implantes ainda mais biocompatíveis com os tecidos ósseo e mole. Assim, o biomaterial utilizado não pode causar danos locais ou sistêmicos, não deve ser tóxico, carcinogênico, alergênico, deve possuir resistência mecânica adequada para distribuir as forças dentro do leito do implante, ter composição química muito próxima da pureza absoluta e com alta energia de superfície. O tratamento de superfície de um implante deve ser reproduzível e sobretudo previsível (TOGASHI, 2001).

Vários sistemas de implantes tem incorporado textura, rugosidade ou poros esperando que o aumento da área de sua superfície promova um maior potencial para inserção celular e crescimento tecidual no interior das irregularidades, estabilizando mecanicamente o implante.

Porém, os diversos tratamentos de superfície que vem sendo desenvolvidos promovem uma reação não específica com vários processos simultâneos na interface implante-tecido biológico, resultando em competição complexa entre reações e resultados imprevisíveis.

Muitas das controvérsias atuais sobre os diversos tipos de implantes e o valor de suas diferentes superfícies poderão ser resolvidos num futuro próximo, se for criada e desenvolvida pesquisas com base científica adequada, uma vez que estamos sempre nos deparando com novos sistemas no mercado.

O cultivo primário de células a partir de tecido ósseo normal, para a obtenção de linhagem celular que apresente características osteoblásticas é de grande aplicação em odontologia, não só em estudos da fisiopatologia óssea como em testes de biocompatibilidade de materiais que estão em contato constante com o tecido ósseo.

Este trabalho tem por objetivo estabelecer um protocolo para futura avaliação da resposta biológica através da cultura primária de células ósseas maxilares frente a microestrutura (superfície) de implantes de titânio cp usinados na Universidade Federal de Santa Catarina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para melhor compreensão e análise desta pesquisa, a revisão de literatura foi dividida em seções abordando aspectos relacionados com: 1) Titânio; 2) Tratamento de superfície e 3) Resposta biológica tecidual e celular.

2.1 Titânio

2.1.1 Biocompatibilidade-Osseointegração

A biocompatibilidade do titânio frente ao tecido gengival foi revelada por Gould; Brunette; Westbury (1981) num estudo *in vitro*, onde evidências histológicas mostraram a formação de hemidesmossomos inseridos entre o titânio e células epiteliais de um implante removido após 7 anos de função. Esta formação de hemidesmossomos indica claramente que o tecido mole da cavidade bucal aceita o óxido de titânio.

Albrektsson et al. (1981) numa revisão de literatura sobre materiais compatíveis observaram que a ancoragem de implantes cerâmicos e Ti c.p. apresentou em resolução de 30Å a 40Å, praticamente os mesmos aspectos com formação de osso haversiano bem orientado e sem formação de camada de tecido conjuntivo interposta.

Albrektsson (1983) observou que feixes colágenos tornaram-se gradualmente substituídos por filamentos aleatoriamente arranjados a distância de 0,1µm a 0,5µm do titânio. Os filamentos colágenos avançaram em direção a superfície do implante alcançando uma distância aproximada de 200Å. Havia uma substância amorfa calcificada parcialmente

consistindo de proteoglicanas e glicosaminoglicanas aderidas ao ácido hialurônico cobrindo 200Å a 300Å da interface ao redor do metal. Nenhum espaço descalcificado foi encontrado entre o titânio e o tecido, porém a calcificação foi menos pronunciada nos últimos 100Å da superfície de titânio. Os processos celulares foram separados da superfície de titânio pela espessura da camada de 200Å a 300Å de Proteoglicana.

Hansson; Albrektsson; Branemark (1983) observaram que implantes de titânio c.p. (parafuso) foram removidos por várias razões, como por exemplo psiquiátricas e fraturas, após sucesso clínico (estáveis) por períodos de 6 meses a 7 anos. Aproveitando estes infortúnios os autores desenvolveram um experimento com o objetivo de descrever a zona da interface implante-tecido ósseo. O osso compacto estava firmemente aderido ao metal não sendo possível destacá-lo sem fraturas. O tecido ósseo adjacente ao implante estava em aparente continuidade com o metal ao redor de toda a circunferência do parafuso de titânio. Ao microscópio óptico o osso estava bem organizado, de maneira regular, com sistema de Havers e lamelas ósseas incrementais que foram observadas ao longo da interface. Os autores interpretaram esta ocorrência, como osso vital e com ativo remodelamento ao redor do implante em concordância com as forças oclusais aplicadas. Vasos sanguíneos foram observados, ocasionalmente, em íntima proximidade com a superfície do implante. Não foi evidenciada a formação de cápsula fibrosa conjuntiva, nem a presença de fibroblastos, macrófagos e células inflamatórias na região da interface implante-osso. Ao microscópio eletrônico de varredura as imagens das peças desmineralizadas do tecido ósseo aderido ao implante revelaram facilmente os sistemas de Havers e um revestimento de fibras colágenas e osteócitos. Como também, osteócitos foram freqüentemente identificados, algumas vezes bem próximos da superfície do metal. As fibras colágenas estavam a uma distância de 1µm a 3µm da superfície do metal separadas por uma camada de glicoproteínas de aproximadamente 20µm de espessura.

2.1.2 Contaminação metálica

Woodman et al. (1984) inseriram substitutos ósseos compostos de fibra metálica à base de titânio em osso longos de gorilas. As concentrações metálicas foram mensuradas no pulmão, rim, baço, fígado, músculo e nos linfonodos adjacentes ao implante nos animais experimentais. Os valores foram comparados com animais controle sem implantes inseridos.

Os autores utilizaram titânio cp de fibra metálica que promoveu um longo contato do tecido ao titânio, sendo os animais acompanhados por 8 anos. Em adição, placas de titânio 6 alumínio – 4 vanádio foram inseridas. Os níveis de titânio aumentaram no tecido do pulmão dos animais teste até 3 anos após a inserção. Posteriormente a este período, os níveis de titânio permaneceram constantes sem nenhuma evidência de toxicidade bioquímica e hematológica. Porém, os autores citaram que não poderia ser excluída a possibilidade de efeitos tóxicos ao longo do período de manutenção. Os autores acreditam que a contínua liberação de alumínio no pulmão possa ser distribuída a outros tecidos. Porém, desconhece-se o potencial de toxicidade neurológica do alumínio e se é capaz de atravessar a barreira do cérebro. Vanádio, conhecido como um material altamente tóxico, não foi encontrado acumulado no corpo dos animais experimentais. Foram descobertas apenas elevações transitórias nos níveis de vanádio no pulmão.

Michaels et al. (1989) afirmaram existirem mais de 35 metais diversos nos implantes, sendo que a maioria dos quais pode ser encontrada em quantidade-traços no organismo humano podendo ser considerados como produtos essenciais para o metabolismo, como tóxicos ou como incidentais.

Buchanan; Lee; Willians (1990) explicaram que os implantes metálicos sofrem corrosão e dependendo da liga empregada, combinações de elementos químicos como ferro, cromo, níquel, cobalto, molibidênio, titânio, alumínio e vanádio, são liberados nos tecidos locais e possivelmente transportados para outros locais do corpo. A longo prazo os efeitos biológicos da liberação destes elementos químicos não estão completamente elucidados.

2.1.3 Energia de superfície e esterilização

Carter et al. (1981) afirmaram que materiais com tensões de superfície de 20 a 30Dynes/cm, exibem uma atividade biológica mínima e que acima destes valores tendem a possuir melhores graus de bioadesão. Esclareceram que o uso do método de descarga incandescente de radiofrequência para esterilização é teoricamente muito atrativo, pois promove uma superfície limpa, sem contaminantes, e um estado de alta energia superficial.

Baier et al. (1982) demonstraram os efeitos degradativos da esterilização convencional original que produzem uma camada superficial espessa com energia de superfície baixa.

Mostraram ainda, que a esterilização por descarga incandescente de radiofrequência, por 3 a 5min, produziu uma alta energia de superfície com o mínimo de contaminantes em amostras com superfícies lisas. Investigaram a formação de uma película biológica e sua influência na bioadesão na interface e concluíram que a qualidade de superfícies do material do implante é essencialmente crítica na determinação da configuração assimilada dos biofilmes mais precoces.

Baier et al. (1984) investigaram a influência de diferentes estados de energia de superfície na incorporação de biomateriais. Ocorreu um aumento da inserção de fibroblastos nos materiais com alta energia de superfície o que resultou em uma película mais fina com a camada celular primária mais próxima do implante, promovendo uma melhor aderência celular. Concluíram os autores que o povoamento celular inicial e adesão celular podem ser influenciadas pela presença de cobertura condicionantes derivadas dos tecidos do hospedeiro, cujas propriedades são dependentes da energia superficial dos implantes.

Doundoulakis (1987) realizou estudo onde mediu e comparou os efeitos de cinco métodos de esterilização sobre a superfície de titânio c.p. (99,835%). As amostras foram preparadas com superfícies lisas e polidas, nas dimensões de 5mmx10mmx1mm e após foram limpas com ultrassom por 10min em detergente, lavadas abundantemente com água triplamente destilada e secas. Os cinco métodos de esterilização avaliados foram:

- a) esterilizador endodôntico em bola de vidro à 425°F, com amostras submersas por 20s;
- b) autoclave à vapor convencional a 250°F com 15psi de pressão por 20min;
- c) calor seco (estufa) 320°F por 60min;
- d) radiação ultravioleta a 150Watt/s, 360 a 450Nm e 8s de cada lado;
- e) tratamento de descarga incandescente de radiofrequência a 13,18 MHZ, energia de superfície efetiva de 5W, câmara de vidro de 2¾ de polegadas com pressão interna de 0,15torr. Superfícies rugosas e riscadas foram observadas em muitas das amostras, num aumento de 80x. Verificou também ausência de filme orgânico contaminante superior a 1000Å ou 0,1µm.

O autor concluiu que a esterilização das amostras por autoclave pode causar comprometimento das propriedades da superfície devido a adesão e materiais orgânicos ou heterogêneos externos, que pode influenciar o sucesso de muitos sistemas de implante. Revelou ainda, informações sobre os efeitos degradativos causados pelo esterilizador endodôntico na superfície do Ti c.p.; que a esterilização por calor seco não conseguiu remover restos orgânicos da superfície das amostras, como não aumentou a energia de superfície das mesmas. A esterilização de materiais de baixa energia de superfície com descarga de radiofrequência incandescente e ultravioleta resultou em melhor limpeza e aumento na energia de superfície que estão correlacionadas com a indução da adesão celular e fixação dos implantes.

Olefjord e Hansson (1993), analisando 4 sistemas de implantes relatam que durante a produção e manipulação suas superfícies são contaminadas. A presença de contaminantes inorgânicos podem catalizar a reação do oxigênio na interface e formar radicais OH que podem aumentar a dissolução do titânio. Em adição, a absorção de íons do óxido do titânio pode aumentar o efeito da concentração do óxido na superfície e por consequência aumentar a taxa de dissolução do metal.

2.1.4 Passivação

Os efeitos da passivação do Ti c.p. e da liga de Ti6Al-4V foram avaliados por Callen et al. (1995) através de Espectroscopia de Fotoemissão de Raio X e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram usinadas e passivadas obedecendo os seguintes passos:

- a) limpeza em ultrassom com solução Decon a 2% por 1h;
- b) lavagem em ultrassom com três banhos de água bidestilada por 5min cada;
- c) passivação em ultrassom com HNO₃ a 34% por 1h;
- d) lavagem final com cinco banhos de água destilada por 5min cada.

As amostras não passivadas utilizaram somente os passos 'a' e 'b'. Após a lavagem final as amostras foram autoclavadas a 121°C por 30min. Para as análises com Espectroscopia

de Fotoemissão de Raio X, quatro amostras de cada metal foram separadas e submetidas a um dos seguintes protocolos:

- a) não passivado (passos 1 e 2) e não autoclavado;
- b) não passivado (passos 1 e 2) e autoclavado;
- c) passivado (passos 1 e 4) e não autoclavado;
- d) passivado (passos 1 e 4) e autoclavado.

Os resultados mostraram existir diferenças significantes do efeito da passivação. O titânio traço liberado à partir do titânio da liga mostrou-se consideravelmente aumentado, no entanto, a quantidade de corrosão no Ti c.p. não foi significativamente diferente. A passivação com ácido nítrico na liga de titânio também aumentou significativamente os níveis de alumínio e vanádio no meio de cultura contendo soro. As análises por Espectroscopia de Fotoemissão de Raio-X revelaram que a passivação removeu a contaminação no Ti c.p. e na liga de titânio. A esterilização por autoclave não afetou os níveis básicos de C, Ca, B, Na e Pb presentes nas amostras não passivadas.

Albrektsson e Hansson (1986) ultra-estruturalmente descreveram a interface osso-superfície de implantes de policarbonato coberta com aço inoxidável ou titânio comercialmente puro. Dez coelhos receberam dois implantes cada um, sendo um implante coberto com aço e o outro com Ti c.p. Daqueles com titânio, cinco animais receberam *Plugs* com camada de titânio evaporada, e nos outros cinco, foram inseridos *Plugs* borrifados com titânio. Três meses após a inserção dos implantes, os animais foram sacrificados. Observaram que nos implantes com titânio não havia tecido fibroso interposto entre o osso e o Ti, ao passo que nos com aço inoxidável, foi observado leito circunjacente de no mínimo uma a duas camadas de células e abundantes células inflamatórias.

Albrektsson e Jacobsson (1987) salientaram que o uso de Ti c.p. inadequadamente controlado provocou a ocorrência de fraturas de implantes no momento da implantação. Por este motivo foi preconizada a utilização da liga de titânio-6 Alumínio-4 Vanádio, no continente americano. É importante saber, que em muitas publicações, esta liga foi citada como “titânio”. Na verdade as reações teciduais podem ser significativamente diferentes entre o titânio cp e a liga de titânio. A composição do Ti c.p. consiste de 99,75% de titânio e 0,05%

de ferro. O conteúdo de Fe de 0,5% dobra a resistência do implante, mais aumenta o risco de corrosão. O conteúdo de Fe de somente 0,005% diminui em muito a resistência.

A relação entre o tempo de indução da precipitação de Fosfato de Cálcio a partir de soluções supersaturadas e a capacidade do Ti em pó e TiO_2 foram avaliadas por Damen; Ten Cate; Ellingsen (1991). O Dióxido de titânio é considerado um mineral polimorfo com cristais de baixa solubilidade, onde a diferença principal é o arranjo dos octaedros de oxigênio constituintes, tais como, anatase e rutilo, que são estruturas tetragonais. Os resultados mostraram que, na presença de poucos miligramas por mililitro de titânio em pó por mililitro de solução, a média do tempo de indução da precipitação do fosfato de cálcio foi reduzida em 66%. Nos casos de titânio em pó autoclavado, mas com quantidades maiores não pode ser obtida redução adicional. Contudo, no titânio em pó brevemente exposto ao ar não houve efeito sobre o tempo de indução. O tempo de indução também não pode ser reduzido pela adição de suspensão de TiO_2 puro na incubação. A precipitação de fosfato de cálcio foi observada a partir de soluções meta estáveis que continham quantidades aumentadas de anatase, rutilo ou titânio em pó metálico. A ausência de TiO_2 manteve a solução estável por no mínimo 24h, sendo a menor quantidade de TiO_2 testada de $0,30\text{cm}^2/\text{ml}$ induzindo a precipitação num espaço de tempo de 15h. Não induziram a precipitação, as concentrações do titânio em pó menores que $0,56\text{ cm}^2/\text{ml}$. Os autores especularam se a indução do precipitado de fosfato de cálcio seria meramente uma expressão de natureza osseofílica do material de implante, ou um passo essencial no estabelecimento da interface osso/metal que propiciaria a integração de tais implantes no osso.

Johansson; Sennerby; Albrektsson (1991) compararam a resposta mecânica e interfacial de implantes fabricados em Titânio c.p. e Vitalium Cirúrgico. Sete coelhos receberam quatro implantes que foram inseridos na metafise tibial, sendo dois implantes de Ti c.p. e dois de Vitalium, com travamento em apenas uma cortical. O período de análise histológica e de torque foi de 3 meses. A análise histomorfométrica revelou que a média de contato osso-metal para implantes de Ti c.p. foi de 34,7% e para os implantes de Vitalium foi de 21,7%. O torque necessário para remoção dos implantes de Ti c.p. foi em média de 24,9Ncm, enquanto para os implantes de Vitalium a média foi de 11,7Ncm. Nestas condições experimentais, demonstraram que o titânio é superior ao Vitalium como material para fabricação de implantes.

Keller et al. (1994) caracterizaram a superfície de discos de Ti c.p. e liga de Ti (Ti-6Al-4V) e realizaram testes biológicos *in vitro*, para observar a resposta de células osteoblásticas. Os espécimes foram cortados de uma barra obtendo 12,5mm de diâmetro por 4mm de altura. Sobre eles, três diferentes rugosidades superficiais foram preparadas: a) superfície sulcada obtida com papel metalográfico de granulação 600; b) superfície rugosa obtida por jateamento com óxido de alumínio de 50 μ m; c) superfície polida obtida com pasta de diamante de 1 μ m.

Os discos foram lavados com solvente e água destilada, passivados com ácido nítrico e esterizados à luz ultravioleta por 30min. A análise da rugosidade e morfologia superficiais foram realizados através de Perfilometria e Microscopia Eletrônica de Varredura. As avaliações por MEV das superfícies preparadas indicaram que não haviam diferenças significantes entre superfícies de Ti c.p. e liga de Ti na rugosidade individual, embora existisse uma diferença estatística entre rugosidade específica. A análise química da superfície foi através de Espectrometria Fotoelétrica e Espectroscopia de Auger (AES) e avaliação do ângulo de contato da gota de água sobre uma superfície lisa. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre as superfícies da liga de Ti e Ti c.p.. A Espectroscopia Fotoeletrônica de R_x de superfície de Ti c.p. e liga de Ti revelaram a presença de contaminantes típicos como C, O e N. Ao comparar os dois metais, a proporção atômica para os contaminantes foram estatisticamente iguais. A presença de vanádio foi encontrado em apenas uma espécime da liga. O alumínio foi encontrada na superfície da liga de Ti e não estava presente no Ti c.p. A análise de Espectroscopia Eletrônica de Auger (AES), com técnica de perfil de profundidade demonstrou que a espessura do óxido de superfície da liga de Ti foi aproximadamente 2,5 vezes mais espesso do que sobre o Ti c.p. A camada de óxido mais espessa e a presença de alumínio na liga de Ti pareceu não influenciar biologicamente a resposta celular inicial, quanto a aderência e morfologia, sendo os níveis de inserção celular e adaptação das células às superfícies, semelhantes. As determinações do ângulo de contato para os dois materiais de implante revelaram que não existiam diferenças significantes entre superfície lisa de Ti c.p. ($52 \pm 2^\circ$) e liga de Ti ($56 \pm 4^\circ$), o que indicou semelhança entre energia de superfície de cada material. Estes resultados indicaram que o Ti c.p. e o Ti6Al 4V são materiais adequados e biologicamente compatíveis para a fabricação de implantes odontológicos.

Larsson et al. (1994), pesquisaram a resposta óssea frente a quatro tipos de superfície de implantes c.p. colocados na tibia de coelhos. As superfícies preparadas foram as seguintes: a) relativamente rugosa com fina camada de óxido (superfície usada na prática clínica); b) lisa com fina camada de óxido produzida por eletropolimento (eletrólito consistindo de 600ml de metanol, 350ml de N-butanol e 60ml de ácido perclórico a 30°C, com voltagem de 22,5V); c) lisa, eletropolida, com camada de óxido de espessura intermediária produzida por anodização (oxidação eletroquímica em 1M de ácido acético à temperatura ambiente usando duas voltagens diferentes de 10V e 80V). A espessura do óxido é linearmente dependente da voltagem aplicada; d) lisa, eletropolida com espessura de óxido produzida por oxidação anódica. As biópsias foram realizadas 7 a 12 semanas após implantação. A resposta óssea foi avaliada morfométricamente. Em 7 semanas pouco osso foi detectado ao redor de implantes eletropolidos, sugerindo que este tipo de superfície não influenciam a taxa de cicatrização óssea. Em 12 semanas nenhuma diferença foi encontrada, embora houvesse maior tendência de formação óssea ao redor dos implantes com óxidos mais espessos. Portanto, a despeito das variações das propriedades superficiais ocorreu pouca diferença na morfologia óssea em torno dos implantes. Segundo os autores, as propriedades químicas superficiais da camada de óxido podem ser benéficas para a deposição óssea, entretanto, a espessura e a microestrutura podem ser menos importantes.

Kipaldi e Lemos (1994) avaliaram a alteração na energia superficial do Ti c.p., Tipo I e II, através do tamanho das partículas da massa do material, da rugosidade da superfície e dos diferentes métodos de tratamento superficial utilizados. O Tipo I foi utilizado em forma de placa enrijecida, com o tamanho dos cristais de massa de 70 μ m. O Tipo II em forma de lâmina prensada, com cristais de massa de 23 μ m. Todas as amostras foram lavadas em H₂O deionizada e imersas em (H₃PO₄) ácido fosfórico a 50% por 30min. Após receberem tratamentos específicos foram divididas em cinco grupos:

- *Grupo A*: placas Tipo I, polidas, não passivadas e tratadas com descarga incandescente de radio frequência por 10min;
- *Grupo B*: placas Tipo I, polidas, não passivadas e não esterilizadas;
- *Grupo C*: placas Tipo I, polidas, passivadas com ácido nítrico e esterilizadas em calor seco (estufa);

- *Grupo D*: lâminas Tipo II, polidas, passivadas com ácido nítrico e esterizadas em calor seco;
- *Grupo E*: lâminas Tipo II, não polidas, passivadas com ácido nítrico e esterilizadas em calor seco.

Nos resultados não apareceram diferenças significantes da tensão superficial crítica entre os grupos 3 (com cristais de massa de 70 μ m) e do grupo 4 (com cristais de massa de 23 μ m), com mesmo tratamento superficial (polidas). Nos grupos 4 e 5 (com cristais de massa de 23 μ m), foi constatado que as superfícies não polidas possuíram valores de tensão superficial significativamente menores do que as polidas.

Effah; Bianco; Ducheyne (1995) com o intuito de identificar a estrutura dos cristais da camada de óxido formada em implantes c.p. utilizaram Microscopia Eletrônica de Transmissão e amostras em pequenos discos de Ti c.p. foram preparadas e limpas com água deionizada, detergente e acetona; passivadas com ácido nítrico 40% a 55°C por 20min; lavadas com seis banhos em água deionizada e secos ao ar; esterilizadas em óxido de etileno e finalmente submersas em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) ou na mesma solução acrescida de EDTA, por períodos de zero hora a 24h, 1 semana e 4 semanas. Os autores observaram que: a) o leito de óxido foi composto principalmente por anatase e rutilo, que são estruturas tetragonais; b) o crescimento de grãos no leito óxido pode ser atribuído a cristais de óxidos nativos, porém o mais provável, é que eles resultaram da formação de nova camada de óxidos. Os autores também acreditaram que a espessura da camada de óxido possa estar relacionada a um processo de dissolução passiva do titânio.

2.2 Tratamento de superfície

Albrektsson (1983) revisou os aspectos biológicos importantes para se conseguir osseointegração do implante de titânio no tecido hospedeiro. Enfatizou que as condições da superfície do implante, sua composição química e fatores mecânicos são fatores importantes para a osteointegração. Estudos da interface osso-implante através de MEV e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), revelaram que o padrão de ancoragem dos filamentos colágenos ao titânio se assemelhavam àqueles das fibras de Sharpey inseridas no osso.

As propriedades de superfície podem determinar o sucesso ou fracasso de projetos de implantes. Kasemo (1983) identificou e estudou estas propriedades sob vários aspectos: preparação do implante; composição química e cristalografia da superfície; propriedades químicas, de ligação e processo químico na interface inorgânico-biotecido. Descreveu ainda alguns métodos experimentais que podem ser usados para caracterizar a interface. Ao estudar rugosidade de superfície preferiu separá-las em rugosidade da superfície macroscópica e microscópica e, rugosidade sob escala atômica. O autor afirmou que o principal papel da rugosidade é poder melhorar a força mecânica do implante, sendo que sua união química, não será afetada pela rugosidade na faixa de $1\mu\text{m}$ ou maior.

Tracy e Doremus (1984) através de Microscopia Eletrônica de Imagem de Campo Escuro e de Luz, Difração de Elétron, Imagem de Alta Resolução e Análise de Energia Dispersa em MEV e TEM (STEM-EDS), analisaram a interface osso-hidroxiapatita. As amostras foram desgastadas (afinadas) de tal modo que o osso e a hidroxiapatita ficaram elétron transparentes. Os resultados apontaram ser a ligação osso-hidroxiapatita próximo ao nível atômico sem intervenção de tecido desmineralizado. As amostras de hidroxiapatita foram implantadas em fêmur de ratos por 3 meses e após, analisadas a nível atômico. O osso esteve diretamente apostado ao implante. Os cristalinos ósseos estavam localizados muito próximo a margem do grão de hidroxiapatita. A distância entre os cristalinos ósseos e a margem do grão foi estimado em 200Å .

Keller et al. (1987) examinaram o crescimento ósseo em torno de implantes cilíndricos de Ti c.p. com poros na superfície variando de $0,6\mu\text{m}$ a $1,0\mu\text{m}$. Os implantes foram colocados na tíbia de 15 coelhos. Quatro a 8 semanas após a implantação, os autores observaram que: a) a quantidade de crescimento ósseo foi menor nos poros menores ($0,6\mu\text{m}$) do que nos poros maiores; b) o padrão de crescimento ósseo pareceu de natureza trabecular nas 2 primeiras semanas; c) com 8 semanas o crescimento ósseo lembrou uma cortical mais densa e ocupou a maioria das áreas porosas. Os resultados mostraram que o crescimento ósseo foi independente do tamanho dos poros e a porcentagem de crescimento ósseo, foi significativa, até 8 semanas após a implantação.

Ratner; Johnston; Lenk (1987) a fim de entender melhor as superfícies dos biomateriais descreveram técnicas capazes de medir as propriedades de superfície, como química da superfície, energia de superfície e morfologia, pois a natureza da superfície do biomaterial governa os processos envolvidos na resposta biológica. Utilizaram as seguintes

técnicas, microscopia, técnica do ângulo de contato, determinação da rugosidade da superfície, medidas elétricas da superfície e três tipos de espectroscopias (Eletrônica para Análise Química-ESCA, de Massa de Ions Secundários-SIMS e infravermelho). Neste trabalho são descritas as características da superfície de alguns biomateriais como metal, vidro, hidrogel, polímeros, poliuretanos e o comportamento da água; são revistas as técnicas utilizadas para medir as propriedades da superfície e discutidas o desenvolvimento, o melhoramento e modernização dos biomateriais através da aplicação das características de superfície. A rugosidade de superfície tem mostrado influenciar as reações biológicas teciduais. Pode ser muito difícil quantificar o grau de rugosidade ou descrever a qualidade da rugosidade, para isto, pode-se utilizar o MEV, Microscópio de Luz e Perfilômetro. Quando se avalia os efeitos da rugosidade sobre interações biológicas o número dos espécimes em experimentos laboratoriais ou animais pode ser reduzido, porém uma descrição quantitativa da rugosidade do material é crítica. O método de perfilometria é muito aplicado na indústria metalúrgica e microeletrônica e ocasionalmente é utilizado na pesquisa de biomateriais.

Sutter; Schroeder; Buser (1988) desenvolveram implantes ocos cilíndricos em forma de parafuso de Ti c.p. rugosos pela cobertura de plasma *spray* de titânio. Os principais critérios para o desenvolvimento do implante foram ampla superfície de ancoragem, menor desgaste ósseo possível na preparação do leito para inserção do implante e volume e tamanho reduzido do implante. Assim, como também, foram considerados outros importantes fatores como resistência e biocompatibilidade do material, microestrutura da superfície e estabilidade inicial. O projeto básico de fabricação dos implantes levou em consideração características e propriedades, a saber: a) ampla superfície de ancoragem; b) mínimo trauma na preparação do leito ósseo; c) menor volume possível da parte de ancoragem; d) adaptação da dureza do metal em relação ao osso; e) promoção da incorporação biológica; f) baixo nível de estresse entre osso-metal. O processo de cobertura com plasma *spray* foi caracterizado por um arco elétrico de 15.000 a 20.000°C a uma velocidade extrema, acima de 3000m/s. O pó de titânio foi introduzido num jato de gás argônio na ponta da chama e foi acelerado aproximadamente 600m/s o que consistiu na solda do pó à superfície formando uma cobertura com espessura de aproximadamente 0,03mm a 0,04mm. A soldagem do plasma de Ti sobre o metal (Ti c.p.) foi testada em experimentos sob carga axial, e que, quando a cobertura de plasma não se separava do metal era porque tinha sido realizada adequadamente. Foram encontrados os valores de 75 a 90N/mm² para a resistência do desgaste.

Carlsson et al. (1988) avaliaram diferentes texturas superficiais entre implantes c.p. em forma de parafuso rugosos e lisos através da medida de torque e resposta tecidual da interface. Num total de 28 implantes colocados no fêmur (articulação do joelho) de sete coelhos, 14 foram lisos (eletropolidos) com rugosidade de 10nm e 14 implantes rugosos com rugosidade de 1000nm. Todos os implantes apresentavam uma camada de óxido de aproximadamente 5nm de espessura. Após 6 semanas, o torque médio para redução dos implantes lisos e rugosos foi respectivamente de 17,2Ncm e 26,4Ncm. Através da microscopia ótica, histologicamente 60% das roscas dos implantes em forma de parafuso com superfícies rugosas e lisas tinham contato com o osso, sem interposição de tecido mole e não foi possível detectar diferenças claras quanto ao grau de aposição óssea direta.

Gammage et al. (1990) compararam a interface osso-implante de implantes cobertos com hidroxiapatita (Integral-Calcitek) com implantes cobertos com plasma de titânio que possuem 2mm coronais polidos (IMZ – Interpare Internacional). Após 16 semanas de implantação na arcada de macacos, as próteses foram instaladas e os implantes submetidos à carga funcional. Neste período as condições clínicas e radiográficas foram analisadas e os animais sacrificados 4 meses após para processamento e análise histológica. As peças não desmineralizadas foram analisadas através de Microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura. Os resultados mostraram não haver sangramento à sondagem e a análise radiográfica revelou reabsorção da crista óssea, justamente na porção coronal do implante IMZ. Histologicamente, ficou evidenciada migração epitelial de 2mm nesta área. Enquanto o implante coberto com hidroxiapatita apresentou formação óssea na porção coronal. Em função do processamento histológico ocorreram rupturas da hidroxiapatita (HA) em algumas áreas do implante, demonstrando que na interface HA-osso a união é mais forte do que na união HA-implante. Foi observado maior quantidade de crescimento ósseo nas áreas examinadas do implante com HA que dos implantes IMZ.

Smith; Pilliar; Chenercky (1991) examinaram diferentes tratamentos superficiais em discos de Titânio-6Alumínio-4Vanádio. Os espécimes foram preparadas de duas formas: superfícies lisas obtidas através do lixamento com papel metalográfico de gramulação 600 e superfícies porosas obtidas através da sinterização de partículas esféricas de 30µm a 300µm de diâmetro. A seguir as amostras sofreram diferentes tratamentos de limpeza e esterilização constituindo seis grupos:

- *Grupo I* - lavados em H₂O destilada e secos à temperatura ambiente;
- *Grupo II* - lavados em H₂O destilada, secos à temperatura ambiente, limpos com detergente e lavados em H₂O destilada;
- *Grupo III* - tratamento anterior e esterilização em autoclave a 121°C por 30min;
- *Grupo IV* - tratamento do grupo II e esterilização por radiação;
- *Grupo V* - tratamento do grupo II, passivação com H₂NO₃ a 40% por 60min. em ultrassom e 3 lavagens com H₂O deionizada, e
- *Grupo VI* - tratamento do grupo II e exposição à plasma de gás argônio por 30min. a 0,3mmHg.

Os autores observaram ao MEV que os diferentes procedimentos de limpeza mostraram semelhanças microscópicas entre as amostras do grupo I e II. Poucas alterações foram evidenciadas entre as amostras esterilizadas por radiação e as amostras lavadas com detergente. Extensas áreas da superfície do implante apresentaram ataque químico com o uso do ácido nítrico. Os autores concluíram que os diferentes procedimentos utilizados promoveram significativas alterações na topografia, morfologia e energia de superfície dos disco Ti-6Al-4V e que estas diferenças podem ter conseqüências no comportamento *in vitro*, nas interações tecido-implante.

Buser et al. (1991) comparam seis diferentes tratamentos superficiais sobre implantes de titânio cp cilindricos perfurados que foram colocados na tíbia de porcos. Os implantes foram tratados da seguinte forma: E-eletropolidos com ranhuras rasas e lisas; SMP – jato de areia com granulação média e HF/HNO₃ obtendo rugosidades médias de 6µm; SL – jato de areia com granulação grande com rugosidade obtida entre 22µm e 28µm; SLA – jato de areia com granulação grande e HCl/H₂SO₄ com rugosidades entre 18µm e 23µm; TPS – plasma de Ti com rugosidade entre 30µm e 50µm e HA – plasma de hidroxiapatita que apresentaram a mesma rugosidade do plasma de titânio. Após 3 a 6 semanas os animais foram sacrificados e as peças foram processadas para análise histológica. Contato direto osso-implante foi observado em todos os grupos, sendo a porcentagem de osteointegração para os grupos E e SMP entre 20% a 25%; o grupo SL entre 30% e 35%; o grupo TPS, 40%; o grupo SLA, entre 50% a 60% e o grupo HA, entre 60% a 70%. O último grupo (HA) mostrou porcentagem de

osteointegração significativamente maior do que os grupos E, SMP, SL e TPS nos dois tempos diferentes de observação. Concluíram que os implantes mais rugosos superficialmente apresentaram maior aposição óssea do que os implantes mais polidos.

Pilliar et al. (1991) estudaram as diferenças macroscópicas e microscópicas de três diferentes tipos de implantes endósseos colocados em mandíbula de cães. Os implantes foram os seguintes: a) Ti c.p. em forma de parafuso; b) cônico de liga de titânio com poros superficiais, mantidos em função por 23 semanas; e c) cônico de liga de titânio com poros apenas no dois terços apicais e em função por no máximo 73 a 77 semanas, assim como o grupo 1. A intervalos regulares era realizada avaliação radiográfica. A análise estatística mostrou variação no índice de crescimento ósseo com o passar do tempo. Observaram que os implantes do grupo 1 estavam osteointegrados, com formação óssea em toda superfície do parafuso. Os implantes do grupo 2 apresentaram crescimento ósseo 4 semanas após a implantação, não havendo sinais de infecção nem perda óssea durante o período de avaliação. O índice de crescimento ósseo ocorreu igualmente independente do período de tempo em função. No grupo 3, observaram claramente melhor crescimento ósseo nos dois terços apicais porosos que na porção coronal sem poros do mesmo implante. Perda óssea na crista alveolar foi observada no primeiro ano apenas nos implantes em forma de parafuso e parcialmente cobertos, porém nestes, limitada à região lisa do implante. Os autores concluíram que as formas (desenho) e superfícies diferentes de implantes não transferem as cargas funcionais da mesma maneira ao osso e podem causar alterações significantes na estrutura óssea. Sugeriram ainda que, ao se cobrir todo o implante com material poroso poderia ser evitada a perda óssea coronal ao redor do implante.

Wong et al. (1995) investigaram a importância da topografia da superfície e composição do material de implante sobre a osteointegração no osso trabecular. Utilizaram Ti c.p., Ti6Al4V e Ti6Al7Nb disponíveis comercialmente. Os tratamentos de superfície foram, jateamento fino, jateamento rugoso, jateamento rugoso mais condicionamento ácido em alta temperatura e cobertura de hidroxiapatita. Os três materiais e os quatro tratamentos de superfície produziram um total de 10 grupos assim distribuídos: três grupos com superfície texturizada fina obtida por jatos de pérola de vidro de 150 μ m a 250 μ m de diâmetro; três grupos com superfície rugosa conseguida por jatos com partículas de alumina de 300 μ m a 400 μ m de diâmetro; três grupos com superfície rugosa, jateadas como no grupo anterior e condicionadas com ácido hidrocloreto e sulfúrico a 125% a 130%, por 5min. e um grupo de

Ti-6Al-7Nb com cobertura de HA. As medidas da rugosidade da superfície obtidas pelo perfilômetro revelaram que o grupo de plasma *spray* de HA mostraram valores de rugosidade mais altos ($6,4\mu\text{m}$) os quais foram mais que duas vezes aquelas das superfícies jateadas e condicionadas-jateadas. As superfícies jateadas fina com pérolas de vidro produziram rugosidade de aproximadamente $1,2\mu\text{m}$. Microscopia Eletrônica revelou que o procedimento de condicionamento ácido produziu uma estrutura de superfície diferente em cada um dos metais utilizados. Os implantes de Ti c.p. condicionados tiveram um limite menor de rugosidade que o jateado, porém esta diferença não foi observada entre as ligas de titânio. A superfície do implante de titânio cp condicionado tinha aproximadamente 2,5 vezes mais picos locais num determinado comprimento. Os implantes cilíndricos foram colocados e adaptados por pressão no osso trabecular do joelho de porcos maduros. Após 12 semanas a osteointegração foi avaliada por teste mecânicos de tração e compressão (para medir a resistência da interface osso-implante) e medidas morfométricas quantitativa (porcentagem de superfície óssea sobre o implante). Os autores verificaram que os implantes cobertos com HA apresentaram osseointegração superior pois a superfície óssea sobre eles foi duas vezes maior que nos grupos metálicos, que por sua vez, mostraram não haver diferença significativa entre eles. Grupo dos implantes cobertos com HA mostraram ainda, maior resistência ao teste de tração (841N). Significante correlação foi encontrada entre a média de rugosidade da superfície de implante e resistência ao fracasso á compressão. Novos métodos para alterar a topografia e/ou estado químico da superfície de implante pode proporcionar novas pesquisas para melhorar as propriedades de osseointegração dos materiais ortopédicos.

Lima et al. (1996) analisaram a superfície de dois implantes nacionais (Intralock e De Bertoli) e compararam com dois implantes importados (TF e Implamed). Através do MEV e Espectrometria de Energia Dispersa observaram a existência de variação na qualidade de acabamento superficial. O implante Intralock apresentou melhor acabamento que o implante De Bertoli, contendo alguns cavacos de usinagem, além da presença de impurezas em alguns pontos da superfície. O implante TF apresentou acabamento irregular devido a limpeza com jateamento e presença de grande número de microcavidades. O implante Implamed apresentou marcas de usinagem nas paredes do filetes das roscas e ausência de cavacos de usinagem. Microanálises detectaram presença de somente titânio nos implantes De Bertoli e Implamed; presença de traços de ferro no implante Intralock e, no TF contaminação superficial por silício. Os autores concluíram que o implante Implamed apresentou melhor acabamento superficial.

Wennerberg; Albrektsson; Lausmaa (1996) avaliaram a topografia da superfície de 60 implantes (parafusos) de Ti c.p. de 6mm de comprimento e 3,75mm de diâmetro que foram divididos em quatro grupos:

- *Grupo I*: 10 parafusos usinados com superfície torneada;
- *Grupo II*: 20 parafusos jateados com partículas de TiO_2 de $25\mu m$;
- *Grupo III*: 20 parafusos jateados com partículas de Al_2O_3 de $25\mu m$;
- *Grupo IV*: 10 parafusos jateados com partículas de Al_2O_3 de $75\mu m$.

Os implantes do Grupo III foram colocados na tibia de coelho e avaliados quanto ao torque de remoção e histomorfometricamente. Os implantes do Grupo IV foram inseridos no fêmur de coelho e comparados morfometricamente. As topografias de superfície produzidas foram numérica e visualmente caracterizadas. A média de rugosidade de superfície (R_a) do implante do Grupo I foi $0,34 (\pm 0,1)\mu m$; do Grupo II – foi $0,96\mu m (\pm 0,3)$; do Grupo III – foi $0,84\mu m (\pm 2)$; do Grupo IV – foi $1,32\mu m (\pm 3)$. Os resultados mostraram que, na tibia de coelhos, os implantes jateados com diferentes materiais e mesmo tamanho das partículas ($25\mu m$) demonstraram resultados semelhantes. Comparando os implantes jateados do Grupo IV aos implantes torneados (Grupo I), os jateados exibiram contato osso-metal significativamente maior depois de 12 semanas no osso do coelho.

Wennerberg et al. (1996) investigaram o efeito da rugosidade de superfície de implantes de titânio e a resposta tecidual em osso de coelho. As superfícies dos implantes foram caracterizadas por perfilometria e técnica a *laser* tridimensional. Os implantes fabricados sofreram tratamentos de superfície por jatos com partículas de TiO_2 de $25\mu m$ ou com partículas de Al_2O_3 de $25\mu m$, $75\mu m$ e $250\mu m$. Os autores concluíram que os implantes com rugosidade média de superfície de $1,0\mu m$ a $1,5\mu m$ pareceram ter melhor retenção óssea e contato ósseo-implante quando medidos histomorfometricamente. Esta superfície foi criada pelo jateamento com partículas de $25\mu m$ a $75\mu m$ resultando em rugosidades médias de $0,83\mu m$ a $1,29\mu m$, respectivamente. A superfície mais rugosa criada por partículas de $250\mu m$ levaram a uma rugosidade média de $2,11\mu m$, o que, não resultou numa melhora da resposta óssea. Considerando as três melhores roscas do parafuso de implante verificou-se que os implantes tratados com partículas de $25\mu m$ obtiveram maior contato osso-implante do que os implantes jateados com partículas de $250\mu m$. Quando foram consideradas todas as roscas do

parafuso de implante não foi detectada nenhuma diferença significativa no contato osso-implante. Ao teste de torque para remoção os valores foram parecidos para os implantes jateados com partículas de 25 μm e 250 μm . A melhor resposta óssea foi observada quando a rugosidade da superfície foi de 1,0 a 1,5 μm .

Larsson et al. (1996) investigaram a resposta biológica (formação óssea na cortical de coelhos) frente à implantes rosqueáveis de Ti c.p.. Tinham também por finalidade, investigar se superfícies com propriedades químicas e estruturas diferentes e topografia de superfície e espessura de óxido, todos juntos ou isolados poderiam influenciar a cicatrização do osso adjacente ao implante. Noventa seis implantes rosqueados foram fabricados, dos quais, 24 apenas usinados, serviram como amostra controle e os restantes 72 foram modificados por método eletroquímico (eletropolimento e oxidação anódica), ficando portanto, assim distribuídos em quatro grupos, com 24 espécimes cada. Exames Micrográficos Eletrônicos de Varredura mostraram que: 1) a superfície somente usinada apresentou rugosidade da superfície irregular de 1 μm ou menor; 2) a superfície usinada e anodizada apresentou sulcos de 1 μm a 10 μm ; 3) a superfície eletropolida pareceu muito lisa; 4) a superfície eletropolida e amodizada apresentou topografia heterogênea com superfície lisa e rugosa chegando a 10 μm . As medidas das áreas da superfície foram vistas por Microscopia de Força Atômica (AFM) e mostraram que: a) superfícies eletropolidas tinham a superfície mais lisa (2,9nm); b) as áreas lisas das superfícies eletropolidas-anodizadas foram tão lisas quanto as superfícies somente eletropolidas e as áreas rugosas tinham 117nm; c) superfícies somente usinadas e usinadas-anodizadas tinham rugosidade de superfície semelhante e intermediária de 30nm e 40nm, respectivamente. Com respeito à modificação da superfície, alto grau de contato osso-implante foi encontrado para a totalidade desta amostra. Os implantes eletropolidos com superfície lisa e fino óxido de superfície, resultou em crescimento ósseo menor ao redor dos implantes que outros grupos, em estágio anterior. Oxidação anódica da superfície eletropolida (que produz área de rugosidade aumentada e camada de óxido mais espesso) tiveram efeito maior sobre a taxa de formação óssea. Aumento da espessura do óxido dos implantes fabricados rugosos não tiveram efeitos significativos sobre a resposta óssea. Os resultados com implantes eletropolidos indicam que uma redução da rugosidade da superfície, diminuem a taxa de formação óssea cortical em coelhos, na fase inicial.

Buser et al. (1998) compararam dois tipos de implantes parafusados de titânio com superfícies caracterizadas inseridos na maxila de miniporcós. Um grupo usinado e

condicionado (osseotite) e o outro jateado e condicionado (SLA). A qualidade das características de superfície dos implantes foram examinadas por MEV. O perfil quantitativo foi realizado por perfilômetro usando um sistema interferométrico à *laser 2* equipado com uma ponta de diamante de $0,6\mu\text{m}$ de diâmetro. Ao longo da circunferência de duas amostras de cada implante foram *scaneadas* três a quatro diferentes áreas num total de 2mm de comprimento de superfície. Utilizando os dados quantitativos obtidos com o perfilômetro foram calculados parâmetros de amplitude diferente, espaçamento e híbridos. Para melhor descrever as características de superfície foram selecionadas como variáveis a rugosidade média (R_a) e o espaçamento médio obtido de picos locais adjacentes (S). A análise pelo MEV mostrou aspectos semelhantes para as duas superfícies, como pequenas microfossas de $1\mu\text{m}$ e $2\mu\text{m}$ de diâmetro provenientes do condicionamento ácido. A superfície osteotite pareceu ter um perfil mais plano em comparação com a superfície SLA. A análise pelo perfilômetro apresentou um valor de $2,0\mu\text{m}$ de rugosidade média na superfície SLA, enquanto na superfície osseotite foi de $1,3\mu\text{m}$. O espaço médio do pico demonstrou valores parecidos para a superfícies SLA ($S = 12\mu\text{m}$) e osseotite ($S = 15\mu\text{m}$). Após 4, 8 e 12 semanas da implantação foram realizados teste de torque à remoção para avaliar a resistência ao cisalhamento da interface osso-implante nos dois tipos de implante, que mostraram diferenças significantes ($p < 0.01$) entre eles. Os implantes SLA revelaram um valor médio de torque à remoção (RTV), em 4 semanas de 109,6Ncm, em 8 semanas de 196Ncm e em 12 semanas de 186,8Ncm. Os implantes osseotite desmonstraram um valor médio de torque à remoção de 62,5Ncm, 87,6Ncm e 95,7Ncm nos mesmos períodos. Concluindo, num período de 3 meses de cicatrização, o RTV médio para os implantes SLA foi de 75% a 125% mais alto que os implantes osseotite.

Ellingsen (1998) utilizou cilindros de titânio e liga Ti-6Al-4V caracterizados e relatou a resposta tecidual, *in vivo*, no fêmur de coelhos. As caracterizações foram conseguidas pelo jateamento com bolinhas de chumbo ou *spray* em chama, realizados no titânio e na liga e pelo *spray* com chama em bastão com hidroxiapatita somente no titânio. O autor concluiu que, independente da química do implante, os mesmos deveriam ter microrugosidades que permitissem fixação das trabéculas ósseas e consequentemente transmissão de forças. Os implantes com superfícies rugosas tiveram melhor resposta óssea com trabéculas ósseas crescendo numa direção perpendicular a superfície dos mesmos.

Placko et al. (2000) examinaram a camada de óxido provenientes de três tratamentos de superfície sobre o Ti c.p. e Ti-6Al-4V. Os tratamentos de superfície foram: polimento mecânico, eletropolimento e o jateamento. Este estudo examinou os vários métodos de caracterização de superfície, os efeitos dos diferentes tratamentos sobre a morfologia (estrutura) de superfície e composição química dos implantes de Ti c.p. e Ti-6Al-4V. As análises foram realizadas por MEV e Microscopia de Força Atômica (AFM) para examinar a estrutura da superfície e Espectroscopia Dispersa de Energia (EDS), Análise de Microsonda Auger (AES) e Espectroscopia Fotoelétrica de Raio X para determinar a composição química. As amostras jateadas e eletropolidas mostraram valores de rugosidade de superfície, mais parecidas, em escalas mais largas; enquanto as amostras polidas e eletropolidas tinham valores próximos de rugosidade, quantitativamente idênticas. Composição do óxido de superfície foi essencialmente dióxido de titânio para todos os tratamentos superficiais. Na Espectroscopia Fotoelétrica de Raio X ou Análise de Microsonda de Auger não foi detectado nenhum Vanádio na liga de titânio que indicasse uma possível depleção da superfície. Porém, foram detectados cálcio sobre as amostras jateadas e cálcio e cloro nas amostras eletropolidas. As superfícies polidas estavam relativamente livres de ranhuras e as superfícies eletropolidas apresentavam morfologia ondulada com alguma porosidade e buracos esféricos. A superfície jateada apresentou visivelmente rugosidade com muitas ranhuras e buracos no metal.

Em termos de equipamentos de medida, processo de filtragem e seleção de parâmetros, Wennerberg e Albrektson (2000) sugeriram padrões para avaliação topográfica dos implantes orais. O desenho do implante/superfície podem ser descritos em relação a forma, ondulação e rugosidade. A forma dos implantes bucais densamente rosqueados pode ser avaliada por métodos disponíveis e aceitos como, perfilometria de varredura à *laser* confocal e interferômetros. Para implantes planos ou cilíndricos pode ser utilizado o perfilômetro de contato mecânico. Medidas tridimensionais deveriam ser realizadas preferentemente, porém em casos excepcionais, medidas bidimensionais podem ser aceitas, mas no mínimo 25 leituras *scans* deveriam ser realizadas. Medidas bidimensionais devem ser sempre realizadas: a) à partir da posição de repouso e perpendicular a direção principal das irregularidades; b) flancos, vales e topos de implantes parafusados deveriam ser avaliados em três diferentes áreas de medida; c) as áreas medidas deveriam ser tão amplas quanto possível para permitirem diferentes comprimentos de onda sobre a topografia (selecionar somente uma porção plana do parafuso para análise é inaceitável); d) implantes cilíndricos deveriam ser medidos no mínimo três áreas diferentes mais amplas quanto possível; e) no mínimo três

amostras de cada grupo deveriam ser avaliadas; f) o tamanho do filtro deve ser especificado e escolhido de tal maneira que valores para ondulação e rugosidade possam estar presentes separadamente; g) para avaliação numérica, no mínimo uma altura, um espaço e um parâmetro híbrido deveriam ser apresentados. Parâmetros de altura preferido são R_a , R_q para 2D e S_a e S_q para 3D. Parâmetros de espaço preferido são S_{na} para 2D e S_{ex} e S_{tr} para 3D deveria ser utilizado. Parâmetros híbridos preferidos são Δq para 2D e $S_{\Delta q}$ e S_{dr} para 3D.

Orsini et al. (2000) analisaram a superfície de 10 implantes usinados e 10 implantes jateados com areia e condicionados com ácido hidrófluorídrico a 1% e ácido nítrico a 30%. Avaliaram a citotoxicidade dos implantes jateados condicionados usando fibroblastos L929 de ratos, diferenças morfológicas entre células (MG63 tipo osteoblasto), adesão e ancoragem celular às superfícies. Os resultados indicaram que o condicionamento ácido após o jateamento eliminou partículas de alumina residual. A rugosidade média (R_a) das superfícies apenas usinadas foi $0,75\mu\text{m}$ e das jateadas-condicionadas foi de $2,15\mu\text{m}$. O teste de citotoxicidade mostrou que os implantes jateados-condicionados tinham efeitos celulares não citotóxicos e pareciam ser biocompatíveis. A superfície rugosa produzida pelo jateamento-condicionamento ácido poderia afetar os mecanismos de adesão celular o que foi mostrado pelo exame no MEV. As células aderidas aos implantes usinados apresentaram uma configuração muito plana, enquanto as mesmas células na superfície jateada-condicionada mostraram morfologia irregular com muitos pseudópodos. Estas irregularidades morfológicas poderiam melhorar a ancoragem celular inicial proporcionando melhor osseointegração para implantes jateado-condicionados.

Sykaras et al. (2000) revisaram a literatura e determinaram alguns parâmetros descritivos da rugosidade de superfície. Sugerem que uma superfície lisa ou pouco rugosa apresenta uma rugosidade média inferior a $1\mu\text{m}$; rugosidade intermediária, entre $1\mu\text{m}$ a $2\mu\text{m}$ e rugosas (rugosidade alta) de $2\mu\text{m}$ a $3\mu\text{m}$. Dependendo do protocolo de manufatura do material, forma e grandeza dos instrumentos de corte, a usinagem do Ti c.p. apresenta superfície lisa com valores de rugosidade média de $0,53\mu\text{m}$ à $0,96\mu\text{m}$, portanto considerada uma superfície lisa ou pouco rugosa. Comumente são observados nas superfícies usinadas, linhas paralelas circunferenciais de $0,1\mu\text{m}$ em profundidade e largura, perpendiculares ao longo eixo do implante. Topografia da superfície pode orientar e guiar tipos celulares específicos, como também, afetar diretamente a forma e função celular. Cobertura de plasma *spray* é um dos mais comuns métodos de caracterização da superfície. O plasma *spray* é

usado para aplicar Ti ou HA sobre núcleos metálicos com uma cobertura de 10 μ m a 40 μ m para Ti e 50 μ m a 70 μ m para HA. A espessura depende do tamanho da partícula, velocidade e tempo de impacto, temperatura e distância da ponta do esguicho à superfície do implante. O valor de rugosidade média conseguida para o plasma *spray* de Ti é de 1,82 μ m e para *spray* plasma de HA é de 1,59 μ m a 2,94 μ m. Jateamento com partículas de vários diâmetros é outro método de alteração da superfície pelo bombardeamento com partículas de óxido de alumínio (Al₂O₃) ou óxido de titânio (TiO₂). Por abrasão a superfície rugosa apresentar-se-á com cavidades, irregularidades e depressões. A rugosidade produzida depende do tamanho da partícula, tempo de jateamento, pressão e distância da fonte de partícula para a superfície do implante. Ao jatear uma superfície lisa de titânio com partículas de Al₂O₃ de 25 μ m obtém-se rugosidade superficial de 1,16 μ m a 1,20 μ m, com partículas de 75 μ m, 143 μ m e 250 μ m produzem superfícies com 1,94 μ m a 2,20 μ m. Esclarecem ainda que, o ataque químico por ácidos é outro processo utilizado para aumentar a rugosidade de superfície. O implante metálico é imerso em solução ácida que corroe sua superfície criando cavidades de tamanho e formas específicas. A resultante microestrutura da superfície será determinada por fatores inerentes a solução ácida, como, concentração, tempo e temperatura. A mais nova superfície produzida em implantes é o jateamento de areia com partículas grandes seguido por condicionamento com ácido sulfúrico hidrocloreto. A literatura relata uma rugosidade média de 1,3 μ m de diâmetro para superfície somente condicionada e de 2,0 μ m para a jateada com areia e condicionada. Constataram aumento no valor de torque a remoção e contato ósseo-implante nas superfícies jateadas com areia e condicionadas. Superfícies sinterizadas porosas são produzidas quando pó esférico de material metálico ou cerâmico torna-se uma massa coesiva com núcleo metálico do corpo do implante. A superfície porosa caracteriza-se pela ausência de cristais pontiagudos, o que, a diferencia da superfície rugosa. Superfície porosa é caracterizada pelo tamanho, forma, volume e profundidade do poro, que são afetados pelo tamanho da partícula esférica e as condições de temperatura e pressão da câmara sinterizadora. A profundidade do poro depende do tamanho da partícula que varia de 44 μ m a 150 μ m, da concentração por unidade de área e a espessura da cobertura aplicada, geralmente de 3000 μ m de espessura. Os autores acreditam que uma profundidade de 150 μ m a 300 μ m parece ser o tamanho ótimo para o crescimento ósseo e contato máximo com as paredes do poro. A forma do poro não parece influenciar o resultado biológico, enquanto o volume do poro (porcentagem de porosidade) necessita ser balanceado criteriosamente aos pontos de contato do metal (força de resistência) com a possibilidade de crescimento ósseo.

Boehs; Friedrich; Steidel (2001) estudaram as alterações da textura das superfícies provenientes da influência dos parâmetros de usinagem e da ferramenta sobre a rugosidade cinemática e de processo associada ao mecanismo de formação do cavaco. Os autores utilizaram corpos de aço ABNT 1045 com três diferentes pastilhas de metal duro que foram torneadas em diferentes avanços. Selecionaram os parâmetros de corte para confecção dos corpos de prova de acordo com o catálogo do fabricante do equipamento para usinagem e sem utilização do fluido de corte. O filtro utilizado foi tipo Gaussiano e Cutt-off 2,5mm, obedecendo norma DIN 4768 para maioria das medições. Rugosímetro portátil e de bancada com quatro diferentes apalpadores foram utilizados. Os valores obtidos foram comparados com valores R_t cinemáticos teóricos obtidos por *software* de CAD e de equação da literatura especializada frequentemente utilizada na estimativa destes parâmetros. Os valores medidos se distanciaram dos valores teóricos mostrando que a rugosidade de processo influenciou os ensaios realizados. Com o aumento do avanço, as curvas com os pontos medidos se distanciaram cada vez dos mais pontos teóricos representados pela equação: $R_t \sim [(f^2/8R\epsilon)]$ que representa a rugosidade cinemática. A partir disto, os autores observaram que o avanço exerce grande influência sobre a rugosidade de processo.

2.3 Resposta biológica tecidual e celular

Rich e Harris (1981) pesquisaram o comportamento celular em meios de cultura frente a superfícies lisas e rugosas. Verificaram que os fibroblastos acumularam-se ao redor da superfície lisa, enquanto, os macrófagos preferiram às superfícies rugosas, que os autores denominaram este fenômeno de “rugofilia”. Esta tendência de superfície rugosas atrair células da linhagem dos monócitos é preocupante, pois sabe-se que os osteoclastos são derivados destas células. Investigaram outro fenômeno “o efeito dois-centro”, uma ponte celular é formada, *in vitro*, com um disco metálico agindo como um centro e parede do recipiente da cultura celular como o outro centro.

Carter (1981) sugeriu o termo “Haptotaxia” para descrever a direção do movimento celular que ocorre em função de diferentes gradientes (energia) do substrato. Células, *in vivo*, aderem-se umas as outras e a matriz extracelular. A colocação de implantes com alta energia

de superfície produz um possível gradiente bioadesivo, onde espera-se que as células se acumulem e se adiram ao implante. Contrariamente, implantes com baixa energia de superfície, espera-se que as células prefiram se aderir entre si ou à matriz extra-celular, o que, frequentemente 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. Os vários fenômenos de comportamento celular citados acima, observados primeiramente *in vitro*, parecem também possíveis *in vivo*. A “rugofilia” descreve a tendência de macrófagos preferirem as superfícies rugosas. A “haptotaxia” pode ser envolvida na formação de cápsulas ao redor dos implantes com baixa energia de superfície. A orientação por contato alinha células e fibras colágenas com as pequenas ranhuras que foram produzidas na manufatura do implante. O efeito dois-centro pode explicar a orientação das células do tecido conjuntivo gengival e das fibras inseridas aos poros da superfície.

Rich e Harris (1981) sugeriram que macromoléculas do exudato celular ficam orientadas paralelamente ao longo eixo das ranhuras da superfície dos implantes, e estas moléculas orientam a movimentação das células sobre o metal. As interações entre as células e os implantes são governados por inúmeros processos físicos e químicos, entre os quais o principal fator é a topografia da superfície do implante. As interações metal-biofluido e metal-tecidos parecem ser fortemente afetadas por diferentes tratamentos da superfície do mesmo metal. Além disso, as propriedades físico-químicas da superfície do material também são afetadas pelo processamento da superfície. Várias modificações na superfície tem sido propostas a fim de aumentar o crescimento de contato ósseo direto e estabelecer uma barreira de tecido conjuntivo para evitar a migração apical de células epiteliais na interface tecidos-implante. A orientação por contato, definida anteriormente, se refere a tendência da locomoção celular ser guiada ou dirigida pela topografia da superfície por substrato, no qual as células estão aderidas. As informações sobre os efeitos das ranhuras dos substratos na orientação celular *in vitro* são extensas, porém, são limitadas as comparações dos mesmos substratos no comportamento celular *in vivo*.

Baier et al. (1984) investigaram a influência de diferentes estados de energia de superfície na implantação (incorporação) tecidual de biomateriais. Dois metais lisos tratados com três energias de superfície diferentes, cada um, foram implantados nas costas (fáscia) de coelhos branco New Zealand que cicatrizaram por 10 e 20 dias. A superfície do implante foi totalmente caracterizada por critério químico-físico antes do posicionamento cirúrgico. Após

remoção cirúrgica da cápsula tecidual gerada pelo animal hospedeiro, análise histopatológica quantitativa usando critério morfométrico padrão foi realizada. O padrão do tecido adjacente revelou aumento de células fibrocítica-fibroblásticas. Estas células estavam planas e ativas produzindo fortes ligações com um filme fino condicionante denominado proteína pré-absorvida mais próxima do implante, promovendo uma melhor inserção e adesão celular, nos materiais com alta energia de superfície. Materiais com baixa energia de superfície estavam cercados por cápsula não adesiva, pobres células com uma interface fibrosa separada de um filme condicionante mais espesso por uma zona mucosa rica em lipídeos. Concluíram os autores que o povoamento celular inicial e adesão celular podem ser influenciados pela presença de coberturas condicionantes derivadas dos tecidos do hospedeiro, cujas propriedades são dependentes da energia superficial dos implantes.

Thoma e Cook (1985) avaliaram o efeito do acabamento superficial na interface osso-implante no fêmur de cães adultos, utilizando cilindros de Ti c.p. com dimensões de 16x16mm. As variáveis analisadas foram o módulo de elasticidade, textura superficial e composição química da superfície do material. As superfícies avaliadas foram: a) polida obtida após usinagem; b) rugosa obtida através de jateamento com óxido de alumínio; c) sobre as superfícies 1 e 2 foi aplicado um filme de carvão pirolítico isotrópico (ULTI), com o objetivo de modificar a composição da superfície dos implantes. Perfilômetro foi usado para avaliação da rugosidade superficial e MEV (SEM) para avaliação qualitativa. Os implantes colocadas transcorticalmente foram biopsiados após 32 semanas, para análise da interface osso-implante. Histologicamente observaram aposição óssea direta as superfícies rugosas, enquanto as superfícies polidas obtidas após usinagem apresentaram extenso tecido fibroso ao longo da interface, com áreas de reabsorção e maior porosidade da cortical. Aos testes mecânicos de carga cíclica e tração as superfícies rugosas mostraram resistência um pouco maior do que as lisas. A presença de cobertura ULTI não afetou significativamente a resposta da interface osso-implantes aos testes mecânicos. Concluíram que a presença da superfície rugosa influenciou amplamente o comportamento interfacial. Os autores alegaram que topografias de superfície de implantes odontológicos influenciam marcadamente o contato celular. Existem quatro princípios do comportamento celular inicial observados em cultura celular que explicam a extensão das interações das células e implantes. Primeiro: guia de contato alinha células e fibras colágenas em sulcos finos, como os produzidos pela manufatura. Segundo: rugofilia - descreve a tendência dos macrófagos de preferir superfícies rugosas. Terceiro: efeito de dois centros - pode explicar a orientação das células ao tecido

conjuntivo mole e fibras inseridas a superfície porosa. Quarto: haptose - pode ser envolvida na formação da cápsula ao redor do implante com baixa energia de superfície. A textura superficial do implante tem o potencial de selecionar certas populações de células e alterar sua função.

Brunette (1988) afirmou que as células crescem com maior intensidade ao redor de substratos rugosos do que lisos. O número, o crescimento, a secreção de proteinases e expressão fenotípica são afetadas pelo formato celular. Logo, a topografia da superfície de um implante tem o potencial de selecionar certas populações celulares em detrimento de outras.

Worthington (1988) esclareceu que os tipos de implantes odontológicos de uso atual são descritos e comentados quanto a forma, material do qual é feito, situação dos pacientes para os quais eles são usados e o limite de idade dos pacientes tratados. Faz previsões de uso futuro, indicações de áreas para pesquisas futuras em função de deficiência do próprio conhecimento explica que os implantes odontológicos podem ser classificados de acordo com a sua posição (periosteal, transosteal e endosteal), seu material constituinte e sua forma ou forma física.

Bases científicas dividida em quatro áreas foram discutidas por McKinney et al. (1988) sobre: biomaterial, biomecânica, biologia tecidual e função do hospedeiro. Biomateriais significa o estudo científico de materiais que são compatíveis com o tecido vivo. Na área de biomateriais são fatores importantes, propriedades físicas do material, potencial de corrosão nos tecidos, configuração da superfície, indução ou ausência tecidual e potencial para inflamação ou rejeição. A existência de guias práticos de manipulação do biomateriais auxiliam os cirurgiões-dentistas. Biomecânica significa o estudo científico do relacionamento força-carga do biomaterial na cavidade bucal. O suporte da prótese, distribuição das forças sobre os rebordos maxilares, reabsorção óssea frente a estresse adverso são questões de biomecânica que rapidamente tornam-se aparentes. Todos estes quesitos exigem base científica para o sucesso da implantodontia. A biologia tecidual, diz respeito, à reação e resposta dos tecidos e das células vivas frente ao biomaterial implantado com sua prótese. A função do corpo hospedeiro exige a necessidade de tentativas clínicas de implante projetado longitudinalmente e cientificamente com quantificação. Clínicos podem realizar a avaliação destes parâmetros.

Young (1988), direcionou as pesquisas futuras da implantodontia em torno: a) de entidades biológicas, com as quais o materiais podem interagir, variando de componentes inorgânicos a organismos completos; b) da composição, que representa a principal variável sobre novo controle, podendo limitar esta variável de material, de pura a compostos heterogêneos e c) da estrutura, que refere-se ao estado físico ou condição da superfície. O autor apresentou duas alternativas de investigação: a) examinar ligas de titânio menos conhecidas de outras indústrias e países quanto a caracterização precisa da superfície e avaliação da resposta biológica. Isto pode determinar diferenças que não são óbvias da química do corpo, e b) modificar a superfície da liga de titânio. A superfície do implante é a chave para a compatibilidade de um implante odontológico. O sucesso comercial da liga de titânio, que tem superfícies altamente variáveis depende da história do tratamento, é marcante, considerando a ampla diferença nas propriedades da superfície e composição atual no mercado. Argumentou que alguns fatores podem afetar a composição da superfície, tais como, microestrutura da liga, operações da máquina, procedimento de polimento, processo de textura, efeito químico residual, processo de esterilização e procedimento clínico.

Baier e Meyer (1988) discutiram os direcionamentos futuros na preparação da superfície de implantes odontológicos. Implantes dentais limpos com alta energia de superfície são seguros e efetivos. Porém existe certa ambigüidade com relação a verdadeira qualidade da superfície de muitos materiais de implantes que tem sido esterilizados e serão implantados em ambiente biológico. Preparação apropriada e manutenção da qualidade da superfície de implantes deverão ser incluídas nas exigências próximas-futuras. Para pesquisa sobre materiais de implante dental os autores recomendam o uso de técnicas analíticas de superfície a fim de identificar, entender e controlar os contaminantes comuns da superfície. Para todos os materiais de implantes confeccionados deve-se exigir especificações dos parâmetros críticos da superfície. Implantes diferentes demandam graus diferentes de interação com a fase biológica adjacente. O tratamento com descarga incandescente é uma técnica que pode promover superfícies uniformes com alta energia de superfície e bioadesividade sobre materiais de implante.

Brunski (1988) afirmou que os implantes bucais tem um propósito biomecânico comum e principal que seria a restauração da função mastigatória. Questionou sobre a função máxima das próteses bucais em relação a sua capacidade funcional. Opinou sobre o relacionamento entre biologia e mecânica que deveria ser o centro para idealização da forma do implante bucal. Para tanto, três assuntos biomecânicos devem ser considerados: a carga

mecânica sobre o implante vivo, transmissão da carga ao tecido interfacial e reações biológicas do tecido interfacial à carga transmitida. Com respeito a transferência da carga mastigatória e a resposta biológica celular, devem ser considerados aspectos macroscópicos e microscópicos relacionados respectivamente ao fenômeno mecânico-biológico e básico. Na interface implante-osso, macroscopicamente, eventos mecânicos deletérios e vantajosos podem ocorrer. Os eventos deletérios estão relacionados com o rendimento ósseo interfacial ou fratura provocados por estados de tensão, compressão, cisalhamento ou combinação destes fatores. Os eventos vantajosos dizem respeito a uma cicatrização normal da ferida cirúrgica, adaptação e reparo ósseo após a implantação. Na verdade existe informação limitada sobre a cicatrização óssea (estrutura, propriedades e função) que ocorre na interface osso-implante. Existe apenas informações da engenharia básica sobre o osso, porém estes dados podem servir somente como um guia para propriedades nas escalas microscópicas e ultra-estruturais.

Gross (1988) refletindo sobre a resposta local do hospedeiro (biocompatibilidade) frente aos implantes odontológicos, opinou que para o desenvolvimento de novos biomateriais é necessário que se determine o limite de carga de íons estranhos e partículas que irão agir sobre a matriz celular e extracelular. Deveriam ser realizadas investigações sobre a bioquímica dos tecidos moles e ósseo relacionadas aos biomateriais. Propriedades biomecânicas dos implantes poderiam ser adaptadas as necessidades individuais dos pacientes, pois novos materiais são candidatos para projetos de implante com função a longo prazo. A resposta do hospedeiro em nível celular e tecidual e resposta dos materiais são fatores que participam decisivamente na biocompatibilidade.

Smith (1988) sobre o material de implante e sua forma sugeriu três linhas de pesquisa, quais sejam: a) desenvolvimento de novos e também modificados materiais como liga de titânio contendo zinco ou nióbio; b) cobertura da superfície como carbono ou hidroxiapatita e utilização de cerâmicas de alta resistência; c) investigação da resposta tecidual na interface frente a procedimentos controlados de caracterização da superfície.

Existem incertezas no conhecimento sobre possíveis influências das características de materiais, forma e textura da superfície sobre a interface tecido-material do implante. Alguns destes questionamentos já estão esclarecidos, porém existem perguntas não respondidas quanto à rugosidade de superfície, além do que as técnicas usuais mostram que as superfícies são altamente variáveis, dependentes do processo utilizado. O desenvolvimento de sistemas de implante futuros dependerão de estudos científicos sob base mais racionais que deverão: a)

identificar e caracterizar novas superfícies e materiais; b) validar procedimentos de caracterização da superfície e avaliar respostas teciduais para superfícies modificadas e padronizadas; avaliar, em animais e humanos, os níveis de liberação iônica (elementos traço) da superfície dos implantes afim de detectar limites normais e patológicos.

Kasemo e Lausmaa (1988), detalharam na interação metal-tecido, a nível atômico, que a mesma é composta de uma fina camada de óxido de titânio de aproximadamente 2nm a 5nm de espessura e de um biofluido constituído de macromoléculas de água, íons dissolvidos e biomoléculas representadas por uma proteína com sua cápsula adjacente de água. A natureza da interação entre os átomos da superfície mais externa do implante e as proteínas e/ou outras biomoléculas é importantíssima para a resposta do sistema biológico ao implante. Irregularidades da superfície de diferentes dimensões influenciam a interação metal tecido, quando as mesmas se igualam à unidades biológicas em tamanho. O implante, uma vez instalado no tecido ósseo é exposto a uma série de íons diferentes, polissacarídeos, carboidratos, proteínas, como também, células como condroblastos, fibroblastos e osteoblastos que reagem com a superfície. Portanto a resposta tecidual dependerá da natureza da superfície e composição dos implantes que influenciarão fortemente a relação resposta celular-superfície, ou seja, a combinação da micro-estrutura e composição química da superfície determina a interação mútua entre o implante e o sistema biológico.

Keller; Grotendorst; Dougherty (1989) avaliaram a aderência celular de fibroblastos humanos sobre o Ti c.p.. Discos foram polidos com papel metalográfico ou pasta diamantada, limpos em solvente, lavados e passivados em ácido nítrico à 30% e novamente lavados em água bidestilada e esterilizados em autoclave, ou óxido de etileno, ou imersos em álcool etílico a 100%. Fibroblastos humanos foram incubados por mais de 1h. Como controle, foram usados plásticos tratados para cultura e aderência celular, o número de células que não aderiram foi quantificado e a porcentagem de células aderidas aos discos foi então calculada. Os resultados mostraram que a aderência celular foi de 76% nas superfícies esterilizadas com óxido de etileno, de 82% nas autoclavadas e de 75% nas imersas em álcool etílico 100%. Os autores concluíram que os procedimentos de esterilização tem o potencial para afetar a respostas biológicas dos implantes.

Michaels et al. (1989) avaliaram a aderência celular sobre superfície de titânio com vários graus de rugosidade. Foram preparadas três superfícies: a) lisa-polidas com pasta de diamantada de 1µm; b) rugosa lixadas com papel de sílica com granulação 600; c) rugosa

jateadas com esfera de vidro. As amostras foram limpas em solvente, lavadas, passivadas e enxaguadas em H₂O deionizada. Após, foram incubadas em meio apropriado com fibroblastos humanos do ligamento periodontal ou osteoblastos de cálcia de ratos por mais de 2h, sendo a porcentagem de células aderidas ao titânio quantificada. Tecido em cultura plástica foi utilizado como controle da aderência celular. Em 15min, superfícies lisas apresentaram 41% de aderência celular no grupo controle e com fibroblastos do ligamento periodontal, enquanto nas superfícies rugosas a porcentagem foi de 28%. Em 2h, a aderência celular foi aproximadamente a mesma para as superfícies lisas e rugosas como no grupo controle (80%). A resposta dos osteoblastos foi diferente em todas as situações. Aos 15min iniciais, a aderência celular foi a mesma para superfícies lisas ou rugosas – 30%. Após 2h, a aderência celular para superfícies rugosas foi de 63% e controle 64%, significativamente maior do que para superfície lisa. Resumindo, os autores observaram que maior porcentagem de células semelhantes a osteoblastos se inseriram nas superfícies rugosas do Ti c.p. produzidas por jato de areia, do que nas superfícies lisas e polidas com pasta de diamante. Concluíram, que células diferentes apresentam respostas variadas à rugosidade superficial, e esta, portanto, pode influenciar a resposta aos implantes.

Chehroudi; Gould; Brunette (1989) estudaram, *in vitro* e *in vivo*, os efeitos de ranhuras de um substrato aberto com titânio no comportamento de células epiteliais. Implantes de resina epoxy com superfícies lisas e com ranhuras foram fabricados a partir de uma matriz de silicone com sulcos em forma de “V” com 10µm de profundidade e coberto com 50nm de espessura de titânio. Os implantes lisos e com ranhuras, de resina epoxy revestidos com titânio foram colocados na região parietal de ratos através da pele. Foi observado que: a) maior número de células epiteliais estavam inseridas nas ranhuras do que nas superfícies lisas adjacentes; b) nas superfícies lisas, os grupos de células epiteliais estavam aleatoriamente orientadas, enquanto na superfícies rugosas as células epiteliais estavam orientadas paralelamente ao longo eixo das ranhuras. Microscopia óptica e eletrônica revelaram que as células epiteliais estavam adaptadas às superfícies dos implantes através de uma lâmina basal e hemidesmossomas. Mensurações histomométricas indicaram que havia um epitélio funcional menor, uma maior inserção conjuntiva e menor recessão nos implantes com ranhuras. Os resultados indicaram então que ranhuras horizontais podem impedir significativamente a migração apical do epitélio sobre os implantes de resina epoxy revestidos por titânio.

Chehroudi; Gould; Brunette (1990) investigaram a ultraestrutura da aderência do epitélio do tecido conjuntivo sobre implantes de resina epoxy recobertos por titânio. Estes

implantes apresentavam dois tipos de superfície: a) lisas (controle); b) com ranhuras micro-usinadas em forma de “V” com três profundidades 3 μ m, 10 μ m e 22 μ m. As amostras lisas rugosas foram colocadas transcultaneamente na área parietal de ratos e após 7 dias, biopsiadas e processadas para microscopia eletrônica. As observações histológicas revelaram que: a) as células epiteliais estavam fortemente aderidas e interdigitadas com as ranhuras de 3 μ m e 10 μ m de profundidade; b) isto não ocorreu nas ranhuras de 22 μ m de profundidade, tendo as células epiteliais feito contato somente com as superfícies lisas entre as ranhuras; c) nas superfícies com ranhuras de 3 μ m e 10 μ m de profundidade e nas superfícies lisas os fibroblastos ficaram orientados paralelamente ao longo eixo dos implantes e produziram uma cápsula de tecido conjuntivo; d) nas superfícies com ranhuras de 22 μ m de profundidade os fibroblastos se inseriram obliquamente aos implantes sendo sua aderência mediada por uma zona amorfa, fina e eletrodensa em contato direto com a superfície do titânio e outra zona fibrilar fina que se estendia da zona amorfa até a membrana celular. A orientação oblíqua dos fibroblastos foi associada com a inibição da migração apical do epitélio levando os autores a considerar que as superfícies rugosas micro-usinadas tem potencial para melhorar a performance destes implantes transcutâneos.

Existe pouca informação confiável sobre a resposta tecidual e celular frente aos implantes odontológicos. Ainda nos falta conhecimentos mais completos sobre os processos químicos, físicos e liberação iônica que ocorrem na interação célula-material, pois a maioria dos trabalhos na literatura não tem caracterizado totalmente o material de implante. Smith; Pilliar; Chernecky (1991) avaliaram diferentes tratamentos superficiais de materiais de implantes odontológicos (amostras cilíndricas) de Ti-6Al-4V, cromo-cobalto-molibidênio, óxido alumínio (Al₂O₃) e hidroxiapatita sintética que foram submetidos a seis procedimentos preparativos. Os resultados mostraram que cada procedimento gerou uma composição única para a superfície mais externa de cada material. Estas diferenças poderiam ser significantes na resposta celular e tecidual. Melhor entendimento destes fatores exige superfícies definidas e reproduzíveis.

Perala; Chapman; Gelfand (1991) em 10 implantes diferentes avaliaram a ativação do complemento C_{3a} e C_{5a} utilizando técnica de radioimunoensaio. Para o teste foram utilizados amostras de soro humano de cinco pacientes periodontalmente saudáveis. O soro foi incubado juntamente com implantes estéreis em tubos contendo polipropileno. Para controle positivo, foi adicionado ao soro quatro gotas de Zimozan (potente ativador do sistema complemento).

Para controle negativo, em condições idênticas, soro foi incubado sem a presença de implantes dentais. Os resultados mostraram que todos os implantes testados ativavam significativamente os fatores do complemento, C₃a e C₅a. Os implantes que causaram, respectivamente, maior ativação do C₃a foram Branemark, Swede-Vent, IMZ cobertos HA; e os que provocaram menor ativação do complemento C₃a foram o Osseodent, Stryker, Integral de Ti liso. Os implantes que causaram maior ativação do C₅a foram Stryker, Bramemark, IMZ (HA) e os que causaram maior ativação do C₅a foram IMZ cobertos com plasma, Osseodent e Swed-Vent. Os autores concluíram que o sistema de complemento pode ser ativado pelo Ti c.p., plasma de titânio e implantes cobertos com HA. Portanto, esta ocorrência pode desempenhar um papel importante na geração e manutenção da osteointegração dos implantes.

Bowers et al. (1992) investigaram a influência das rugosidades de superfície do titânio cp na aderência de células osteoblásticas. Discos de titânio cp foram preparados para produzir três tipos de superfícies, que foram: a) grupo-controle foi polido com papel metalográfico de gramulagem 600 para realizar a medida da rugosidade no perfilômetro; b) superfície com morfologia regular foram produzidas pela aplicação de papel metalográfico de gramulagem 60 ou 120; c) superfície com morfologia irregular foram produzidas pela aplicação de papel metalográfico de gramulagem 600 seguidos de jateamento com óxido de alumínio com partículas de 50µm ou condicionados pelo ataque ácido com 3,5% de HF, 25% de HNO₃ por 1,5 ou 10 minutos. Todos os discos foram limpos com solvente, lavados em água destilada, passivadas em ácido nítrico, lavados novamente em H₂O destilada, secos a vácuo e esterilizados. Utilizaram o perfilômetro para determinar a rugosidade superficial, o meio de cultura com células de calvária de ratos, a fim de verificar a adesão celular, e a microscopia eletrônica de varredura para analisar as características morfológicas das células em relação aos diferentes tipos de superfície e os intervalos de tempo. Os resultados sugeriram que o tipo de rugosidade da superfície de Ti c.p. modifica a resposta biológica inicial e a aderência celular. A superfície com morfologia irregular produzida pelo jateamento pareceu mais atrativa para a aderência celular do que a superfície rugosa por papel metalográfico ou pelo condicionamento ácido.

Weinlaender (1992) pesquisando três superfícies de implantes, parafuso de titânio cp (Nobelpharma), cilindro de plasma de titânio (IMZ) e cilindro de titânio coberto com hidroxiapatita (integral), encontraram porcentagem significativamente maior de contato ósseo ao longo dos implantes cobertos com hidroxiapatita do que aquelas de titânio e plasma de

titânio. O osso ao redor dos implantes revestidos com hidroxiapatita pareceu mais denso, indicando uma resposta mais favorável do tecido ósseo. Porém, em função da observação de reabsorção do revestimento de hidroxiapatita em alguns locais, estudos futuros devem avaliar a estabilidade a longo prazo destas coberturas. O tricálcio fosfato possui propriedades osteocondutivas e também forma uma bioreação química entre o cálcio e o fosfato do tecido ósseo. Em implantes revestidos com esta cerâmica, o tricálcio fosfato é parcialmente reabsorvido pela dissolução e fagositose macrofágica. O crescimento ósseo nas lacunas de reabsorção pode resultar em uma ancoragem mecânica primária do implante.

Könönen et al. (1992) avaliaram, *in vitro*, a adesão, orientação e proliferação de fibroblastos gengivais humanos sobre a superfície de titânio cp com diferentes tratamentos superficiais, através de microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de fluorescência e contagem celular. Inicialmente foram construídas placas de titânio cp nas seguintes dimensões 10x10x1,7mm e polidas com papel metalográfico de SiC umedecido com granulações sucessivas de 240 a 1200Grit. Posteriormente, foram submetidas aos seguintes tratamentos superficiais: a) eletropolimento em 20ml de solução de ácido perclórico (HClO₄), 240ml de metanol e 140ml de butanol a 30°C durante 10min; b) condicionamento ácido pela solução de ácido hidrófluorídrico (10ml HF, 3ml de HNO₃ e 50ml de H₂O) por 1min; c) jateamento com cristais de óxido de alumínio de 5µm a duas atmosferas de pressão. Concluídos os tratamentos superficiais acima todas as amostras foram lavadas extensivamente em metanol a 99%, limpas em etanol 99% no ultrassom por 20min e secas à temperatura ambiente. Só então, neste momento, foram incluídas no meio de cultura de células de fibroblastos gengivais humanos. Utilizando um instrumento de traçado da superfície (perfilometro) e espectroscopia eletrônica para análise química foram analisadas a textura, o estado químico e a composição das superfícies de titânio. Os resultados mostraram que: a) a composição química variou consideravelmente em todas as amostras; b) a camada mais superficial de óxido constituiu principalmente de TiO₂; c) a contaminação com C e Ca esteve presente em todas as amostras; d) as superfícies eletropolidas foram as superfícies menos contaminadas por outros elementos. Os resultados no teste biológico mostraram que: a) após a primeira hora de cultura, a adesão celular foi extremamente maior nas superfícies eletropolidas; b) após 3h foi observada adesão celular em todas as superfícies; c) ocorreu crescimento e migração celular para os três tipos de tratamento superficial; d) as superfícies eletropolidas promoveram um maior contato entre as células e o substrato do que as superfícies rugosas. Os autores concluíram que o estado físico, o conteúdo de contaminantes

superficiais e as propriedades das camadas de óxido podem afetar o comportamento celular sobre as diferentes superfícies.

Piattelli; Trisi; Emanuelli (1993) realizaram análise histológica, *in vitro*, de dois implantes com cobertura de hidroxiapatita, que estavam funcionais por 12 e 30 meses respectivamente. O exame ao microscópio eletrônico de varredura equipado com um sistema (Wet) a *laser* mostrou que: a) a ligação da interface cobertura de hidroxiapatita ao metal titânio estava interagida com excelente intimidade entre os dois materiais; b) a existência de uma camada de coloração escura, na interface osso-implante que pode ser resultado de material orgânico depositado nas superfícies do osso e da hidroxiapatita representada por um filme de mucopolissacarídeos ou lacuna preenchida por fluidos extracelulares; c) presença de fibras na interface, ligando o osso a hidroxiapatita; d) ao longo da interface os canalículos ósseos estavam preenchidos por osteócitos, demonstrando uma área de troca biológica ativa. A desinserção da interface osso-hidroxiapatita pode ter sido causada pelos vários passos da técnica de remoção do implante da mandíbula dos pacientes, ou por forças de trituração extensas exercidas durante sua preparação. Osseointegração ultra-estrutural parece ser conseguida pela utilização de implantes cobertos com HA sob condições de carga, em humanos.

Meyle; Gültig; Nish (1995) compararam o comportamento de fibroblastos gengivais, ceratinócitos gengivais, monócitos, macrófagos e neutrófilos sobre uma mesma textura superficial usando microscopia de fluorescência. Cem por cento dos fibroblastos e 20% dos monócitos e macrófagos mostraram orientação em direção à rugosidade do substrato. Entre os diferentes tipos celulares, provavelmente, é variável a importância do citoesqueleto e receptores para adesão, o tamanho da microestrutura e o quanto é necessária para exercer um efeito de orientação. Portanto, a superfície que causa quimiotaxia dos fibroblastos, podem não produzir o mesmo efeito para outras células.

Martin et al. (1995) avaliaram, *in vitro*, o papel da rugosidade superficial na proliferação e diferenciação osteoblástica e na síntese de proteínas. Os discos de titânio foram previamente tratados com ácido hidrófluorídrico e ácido nítrico. Posteriormente, foram realizados diferentes tratamentos superficiais para modificar as rugosidades iniciais da superfície dos discos sendo divididos nos seguintes grupos: PT – lavados em H₂O deionizada, neutralizados em bicarbonato de sódio a 5% e novamente lavados três vezes em água deionizada por 5min em ultrassom; EP – eletropolidos em um banho de ácido de Fluhmann

Ag, lavados em água deionizada, neutralizados em bicarbonato de sódio a 5% e lavados três vezes em H₂O deionizada por 5min em ultrasom; FA – lixados com disco de carborundum com 6 grãos de variação (de 0,12µm a 0,25µm), condicionados com ácido hidrofúrico e ácido sulfúrico, lavados em H₂O deionizada, neutralizados com bicarbonato de sódio 5% e lavados três vezes em água deionizada por 5min em ultrasom; CA – lixados com discos de carborundum com grãos de 0,25µm a 0,50µm, condicionados com hidrofúrico e ácido sulfúrico, lavados em H₂O deionizada, neutralizados em bicarbonato de sódio a 5% e lavados três vezes em H₂O deionizada e ultrasom, e TPS – lixados iguais no grupo Ca, aplicados plasma de titânio e lavados com água deionizada por três vezes no ultrasom. Após os discos foram esterilizados em autoclave e colocados em meio de cultura de osteoblastos humanos (MG63). Como métodos de análise foram utilizadas a microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de varredura a laser, análise por dispersão de energia Raio X, espectroscopia eletrônica de Auger, síntese de DNA, proliferação celular, atividade da fosfatase alcalina, sínteses de proteínas, RNA e proteoglicanas. Os resultados mostraram a seguinte seqüência de rugosidade, do mais liso para o mais rugoso: EP, PT, FA, CA e TPS. A camada de TiO₂ esteve presente em todas as amostras, porém a espessura variou de 100Å no grupo mais liso e até 300Å na mais rugosa. A aparência de todas as superfícies não foi afetada pela esterilização. A incorporação de timidina e fosfatase alcalina diminuiu com o aumento das rugosidades dos discos, exceto no grupo CA com relação a fosfatase alcalina. A atividade enzimática somente diminuiu nas culturas com discos dos grupos FA e TPS. A correlação direta entre a rugosidade superficial e a produção de RNA e colagenase digerível também foi observada. A síntese de proteínas foi inibida em todas as superfícies estudadas, com maior inibição para os grupos CA e EP. Os autores sugeriram que a rugosidade superficial dos implantes pode desempenhar algum papel na determinação da expressão fenotípica das células *in vivo*. Atualmente aceita-se que o sucesso dos implantes depende das propriedades de superfície. Porém, pouco se conhece sobre os efeitos da rugosidade de superfície sobre o metabolismo celular ou diferenciação celular ou se o efeito varia com o estado de maturação provenientes da interação das células com os implantes.

Schwartz et al. (1996) utilizaram células derivadas de estágios conhecidos do desenvolvimento endocondral para examinar o efeito da rugosidade de superfície do titânio sobre a síntese da matriz, proliferação e diferenciação dos condrócitos. Estas células derivadas da zona de repouso (Rcs) e zona de crescimento (Gcs) da cartilagem costocondral de ratos foram cultivadas sobre discos de titânio preparados da seguinte forma: PT – lavados e

condicionados HF-HNO₃; EP – eletropolidos e condicionados HF-HNO₃; FA – lavados e condicionados com HCl-H₂SO₄ e jateados com areia fina; CA – lavados e condicionados com HCl-H₂SO₄ e jateados com areia grossa e TPS – plasma *spray* de titânio. As superfícies foram analisadas e classificadas da mais lisa para a mais rugosa: EP, PT, FA, CA e TPS. Proliferação celular foi avaliada pelo número de células e incorporação de timidina, enquanto a síntese de RNA foi avaliada pela incorporação de uridina. A diferenciação foi determinada pela atividade específica da fosfatase alcalina (ALPase). Produção da matriz foi mediada pela incorporação de prolina dentro de proteínas digestivas-colágenas (CDP) e não-colagenase (NCP) como também pela incorporação de sulfato na proteoglicana. Células da zona de crescimento exigiu duas tripsinizações para remoção completa das culturas do disco. O número de células liberadas pela primeira tripsinização foi geralmente diminuída com o aumento da rugosidade da superfície, enquanto na segunda tripsinização este número aumentou. Em culturas de células da zona de repouso, o número de células diminuiu em superfícies rugosas; um número mínimo de células (Rcs) foram liberadas pela segunda tripsinização. Incorporação de timidina pelas Rcs diminuiu com o aumento da rugosidade da superfície enquanto que pelo Gcs foi aumentada. Incorporação de uridina por Gcs e Rcs foi maior sobre superfície rugosa. A fosfatase alcalina na camada celular e células isoladas dos dois tipos de células diminuiu. Produção de Gc, CDP e NCP diminuiu sobre as superfícies rugosas enquanto a produção de CDP pelas células Rc diminuiu sobre superfícies. Incorporação de sulfato pela Rcs e Gcs diminuiu em todas as superfícies comparado ao plástico da cultura de tecido. Os resultados indicaram que a rugosidade da superfície afeta a proliferação, diferenciação e síntese de matriz e que esta regulação depende da maturação celular.

Ruano; Jorge; Jaeger (1996) estudaram *in vitro* o crescimento e a viabilidade de fibroblastos NIH 3T3 crescidos sobre substrato contendo hidroxiapatita. Os fibroblastos foram cultivados nas mesmas quantidades sobre 18 placas de Petri cobertos com colágeno que serviram de controle e 18 placas cobertas com colágeno e hidroxiapatita (HA), denominadas culturas tratadas. Durante 6 dias, três culturas de cada grupo foram contadas diariamente após o plaqueamento, obtendo-se a porcentagem de viabilidade celular. Microscopia de luz e MEV foram utilizadas para observar a morfologia das células, sendo constatado que estas, cresceram em íntimo contato com os cristais de hidroxiapatita. O crescimento das duas culturas foi semelhante até o terceiro dia após a plaqueamento. A partir do quarto dia ocorreu um atraso de 24h nas culturas tratadas em relação às controles. A viabilidade celular das

culturas tratadas foi de 64,38% ($\pm 2,24\%$) sendo significativamente menor ($p > 0,01$) que a das culturas controles que foi de 94,80% ($\pm 0,10\%$) durante todo o experimento. Porém, no sexto dia de cultivo não havia diferença estatística entre o número de células tratadas e controle. Os autores comprovaram *in vitro* que a hidroxiapatita é uma substância biocompatível. Acreditam que o atraso no crescimento celular e a menor viabilidade provavelmente foram conseqüências da presença física dos cristais de HA que competiram pelo espaço cultivável das placas.

Siqueira e Dias (1996) analisaram o comportamento histológico e clínico de implantes do sistema INP cilíndricos com superfície rugosa (obtidas por tratamento mecânico-químico), em diversas situações: a) bloco de osso ilíaco humano contendo implante submerso por 5 meses foi preparado para análise em microscopia de luz; b) foi discutido um caso clínico mandibular com seis implantes instalados; c) 688 outros implantes colocados assim distribuídos, 293 na maxila, 288 na mandíbula, 8 no osso ilíaco, 93 na tíbia de coelhos e 6 para ancoragem ortodôntica. Todos os implantes foram colocados entre 1991 e 1995. Avaliação da rugosidade de superfície dos implantes foi realizada ao MEV. A biologia apresentada mostrou capacidade de osteocondução e osteointegração das superfícies dos implantes utilizados compatíveis com os resultados clínicos e experimentais realizados nos últimos 4 anos.

Para De Santis et al. (1996) a osteointegração de implantes endósseos as condições de superfície atuais mostram-se promissoras a curto e longo prazo em função dos estudos em torno da microestrutura. Superfícies preparadas e submersas em cultura de células ósseas humanas foram medidas ao longo do tempo conduzindo o meio a taxas de atividade metabólica, de multiplicação e de mutação de células osteoprogenitoras. Os autores, apoiados em informações sobre rugosidade de superfície, métodos de observação da superfície (confocal a *laser* e outros) e análises histo-celulares chegaram as seguintes conclusões: a) que as coberturas de hidroxiapatita (HA), altamente polida (HA-Pol) ou depositada por plasma (HA-PS) induz a proliferação de relativos precursores de pré-osteoblastos não diferenciados, permitindo simultaneamente o funcionamento destes e de osteoblastos presentes nos cultivos. A secreção de osteocalcina pelas células humanas cultivadas foi maior frente as superfícies HA-PS do que nas HA-Pol. Salientaram que a superfície rugosa de HA favorece uma atividade exocitótica mais intensa na parcela da população não expansível de osteoblastos que, em parte, sobreviveram provavelmente nos cultivos tridimensionais localizados nas depressões e vales existentes nas superfícies HA-PS. Estudos, tem reportado que os cultivos

tridimensionais permitem uma expressão muito mais intensa de funções diferenciadas específicas que no caso de cultivos bidimensionais como no caso de superfícies testadas de HA-pol; b) igualmente acima, a secreção de osteocalcina foi muito mais intensa em cultivos celulares com superfícies de Ti depositadas por plasma (Ti-PS) do que nas superfícies de Ti muito polidas (Ti-pol); c) advogaram que para análise de superfície de implantes frente a células humanas cultivadas é preferível escolher superfícies de Ti a superfícies de HA. Dentre as superfícies de Ti, as superfícies polidas têm algumas vantagens a curto prazo, porém a longo prazo as superfícies depositadas por plasma (Ti-Ps) mostraram maiores taxas de proliferação (DNA sintético) e metabólicas (atividade ATP). Portanto, as superfícies Ti-PS parecem ser melhores para aplicações clínicas do que as superfícies de Ti-pol. No entanto, as influências da microestrutura e rugosidade superficial sobre a osteointegração parecem não estar perfeitamente definidas, estabelecidas e esclarecidas necessitando mais estudos para sua elucidação.

Gottlander et al. (1997) compararam a reação óssea de implantes de Ti c.p. parafusados não-tratado (controle) com implantes parafusados de Ti c.p. com cobertura de fosfato de cálcio (experimental) colocada por deposição eletroforética. Os implantes foram colocados na tíbia e no fêmur de animal e estudados nos períodos de 4 semanas e 6 meses. A rugosidade da superfície tridimensional do implante coberto com fosfato de cálcio foi três vezes maior que o controle. Análise histomorfométrica do contato direto osso-implante demonstraram uma vantagem a curto prazo dos implantes experimentais. Enquanto nenhuma diferença significativa do implante controle foi encontrado depois de 6 meses. A quantidade de osso dentro das roscas mostrou valor similar entre os dois grupos, depois de 4 semanas. Depois de longo período de manutenção quantidade maior de osso próximo ao implante foi observado no grupo experimental. Implantes na tíbia em 4 semanas apresentaram porcentagem de contato osso-implante de 5,4% (controle) e 17,4% (experimental); a porcentagem nas três melhores roscas foi de 9,2% (controle) e 30,8% (experimental) e quanto a porcentagem média de preenchimento ósseo foi de 34,7% (controle) e 42,1% (experimental). Para implantes femurais de 4 semanas, a média de contato ósseo foi 51,8% (controle) e 51% (experimental). Quando avaliado em 6 meses, implantes na tíbia apresentaram média de contato ósseo de 37,6% (controle) e 37,8% (experimental); as três melhores roscas para controle foi 57,3% e para experimental 5,8% e a porcentagem da área de superfície óssea foi 60,6% (controle) e 41,8% (experimental). Os implantes femurais no mesmo período tiveram média de contato ósseo de 43,5% (controle) e 47,3% (experimental);

as três melhores roscas 54,4% (controle) e 63,4% (experimental) e a média de área de superfície óssea, 69,6% (controle) e 44,3% (experimental). Os implantes cobertos com fosfato de cálcio apresentaram três vezes mais rugosidade de superfície do que o parafuso de titânio controle, sendo revelada pela análise topográfica da superfície.

A inserção de células e fibras aos implantes é complexa, pois envolvem três tipos de tecidos distintos: o epitélio, o tecido conjuntivo gengival e o osso. Na região cervical dos implantes Ti onde a superfície tem acabamento liso, observa-se a orientação das fibras gengivais paralelas à superfície do implante enquanto na superfície porosa, coberta por plasma Ti, as fibras tendem a assumir uma orientação perpendicular. Inque et al. (1999) confirmaram estes achados, *in vitro*, pois fibroblastos que crescem ao redor de disco de Ti tendem a se tornarem orientados paralelamente aos discos com superfície lisa e perpendicularmente nos discos com superfície porosa. O exato mecanismo que afeta a orientação das células e fibras em relação à superfície lisa ou rugosa não é conhecido. A superfície porosa parece facilitar a ancoragem de células e fibras orientadas perpendicularmente à superfície o que promove uma melhor inserção ao material implantado.

Proussaefs et al. (2000) apresentaram avaliação clínica, radiográfica e histológica de um relato de caso de dois implantes em forma de raiz cobertos por hidroxiapatita removidos da maxila de um paciente após 7 anos de função. Clinicamente os implantes apresentaram-se imóveis sem sinais de patologia. Radiograficamente verificaram a proximidade do osso à superfície do implante sem evidência de radiolucidez. Histologicamente, os dois implantes pareceram estar bem integrados com o osso circundante, ou seja, superfície dos implantes tiveram aposição óssea na interface de ordem de 84% e 79%. Não ocorreu evidência de dissolução da cobertura de hidroxiapatita parecendo estar o osso em contato imediato com a cobertura. Estas observações sugerem que uma cobertura de hidroxiapatita sobre implantes em forma de raiz podem resistir a degradação durante a função a longo prazo.

Dalton et al. (2001) estudaram a resposta da migração epitelial a microsulcos de 1µm a 50µm de profundidade com largura entre as cristas do sulco de 1µm, 2µm, 5µm ou 10µm em um substrato de poliestireno. A migração tecidual ocorreu ao longo do microsulco e foi inibida no sentido de atravessá-los. Células epiteliais de uma monocamada de cultura migraram seguindo um padrão similar daquele do tecido epitelial intacto. Extensões celulares geralmente seguiram a direção do microsulco por seguir do topo da crista ou a parede da crista, observado pelo MEV. Dentro da camada basal do tecido, filamentos de actina foram

alinhados com os microsulcos e filamentos distintos na camada superficial da camada basal não pareciam ser afetados pela presença do microsulco subjacente. A camada basal do tecido adaptou-se aos contornos do microsulco seguindo a migração. Entretanto, a ultra-estrutura do tecido acima da crista ficou parecido àquele do tecido sobre uma superfície plana. Os autores concluíram que a superfície com microsulcos tem o potencial imediato de direcionar a migração do tecido epitelial adjacente com a finalidade de gerar o epitélio sobre a superfície do biomaterial implantado.

Schmidt; Ignatius; Claes (2001) observaram as reações teciduais testando o comportamento dos osteoblastos, *in vitro*, sobre implantes de Ti c.p., Ti-6Al-7Nb, aço inoxidável e Thermanox com estrutura de superfície similares para aplicação clínica. A caracterização da superfície foi realizada por MEV e perfilometria. Após foram mensuradas proliferação celular, parâmetros de diferenciação da atividade de fosfatase alcalina (ALP) e osteocalcina. Para todos os materiais, a curva de crescimento mostrou cinética semelhante. Atividade de fosfatase alcalina foi bastante menor sobre a liga Ti-6Al-7Nb, quando comparado ao aço e Ti c.p., e que não mudou com o passar do tempo. Níveis de osteocalcina foram maior sobre o titânio cp que sobre o aço. Baseado no crescimento celular, níveis relativamente elevados de fosfatase alcalina e osteocalcina, os autores sugerem que o Ti c.p. promove melhor biocompatibilidade com relação a proliferação e maior confiabilidade para os marcadores de diferenciação precoces e tardios dos osteoblastos humanos *in vitro*. A característica dos perfis dos implantes era lisa com valores Ra entre 0,19 μ m e 0,38 μ m e valores Rt entre 1,45 μ m e 3,16 μ m. Ao MEV, o Thermanox mostrou uma superfície muito lisa com quase nenhuma elevação e depressão, sendo que os valores de rugosidade estavam em nível de nanômetros. A superfície do aço inoxidável estava lisa, com traços de polimento e algumas elevações uniformemente distribuídas sobre a superfície. Na superfície do Ti c.p. existiam depressões e ranhuras de diferentes profundidades resultantes de processos de manufatura e a liga de titânio mostrou cristais proeminentes de aproximadamente 5 μ m a 10 μ m.

3. PROPOSIÇÃO

Implantes de titânio comercialmente (Ti c.p.) com diferentes texturas superficiais foram fabricados na Universidade Federal de Santa Catarina, num trabalho conjunto entre CEPID – Centro de Estudo de Pesquisa em Implantes Dentários e o Departamento de Engenharia de Materiais. O presente trabalho tem como objetivo estruturar um protocolo biológico de cultura de células osteoblásticas para avaliar, *in vitro*, o crescimento e adesão frente as diferentes rugosidades dos implantes odontológicos obtidos por usinagem e com potencial de favorecer a osseointegração.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do implantes

4.1.1 Titânio

A matéria-prima Ti c.p. mundialmente reconhecida e eleita para fabricação de implantes odontológicos apresenta a seguinte composição química: 95,75% de Ti, 0,05% de Fe, 0,1% de O, 0,03% de N, 0,05% de C e 0,012% de H. O titânio foi fornecido em barras cilíndricas de 4,76mm de diâmetro e 1,800mm de comprimento pela empresa Ti Brasil Titânio Ltda – Jandira – SP – com a especificação ASTM F67G2.

4.1.2 Equipamento para fabricação dos implantes

Utilizou-se um torno com comando numérico, da marca Romi Mazak, modelo Cosmos 10U, com potência instalada de 10Kva, para o torneamento cilíndrico dos implantes de titânio.

4.1.3 Ferramentas utilizadas no torno com comando numérico

Para fabricação dos implantes foram utilizadas ferramentas fornecidas pela empresa Thijam Comércio e Representações Ltda – Sadvik Coromant – Joinville – SC. (TAB. 1).

Tabela 1 – Especificações das ferramentas utilizadas.

| Ferramenta | Suporte | Pastilha de Metalduro | Raio de Quina | Fabricante |
|------------------|----------------|-----------------------|---------------|------------|
| VBMT 16 04 04-UM | SVJBR 2020K 16 | H13A | 0,2mm | SANDVIK |
| VBMT 11 02 02-UF | SVJBR 2020K 11 | H13A | 0,2mm | SANDVIK |

4.1.4 Amostras para o estudo experimental

Os implantes de Ti c.p. foram usinados pelo USICON – Laboratório de Usinagem e Comando Numérico do Departamento de Engenharia Mecânica – UFSC. Quatro tipos de implantes cilíndricos rugosos com dimensões de 3,75mm de diâmetro por 7mm de comprimento foram seccionados ao meio, em seu comprimento, com uma serra circular de aço rápido para possibilitar sua estabilização física no recipiente de cultura.

A serra circular utilizada apresenta as seguintes dimensões: 63mm de diâmetro externo, 0,6mm de espessura e com um furo interno de 16mm.

A usinagem foi realizada com parâmetros de corte distintos, resultando em amostras com textura de superfície diferentes, como segue abaixo:

- *Grupo 1*: 8 implantes usinados com $V_c = 40$ m/min e $f = 0,05$ mm
- *Grupo 2*: 8 implantes usinados com $V_c = 40$ m/min e $f = 0,10$ mm
- *Grupo 3*: 8 implantes usinados com $V_c = 40$ m/min e $f = 0,13$ mm
- *Grupo 4*: 8 implantes usinados com $V_c = 40$ m/min e $f = 0,15$ mm

4.1.5 Equipamento para mensuração da rugosidade de superfície do implante

Rugosímetro Perthometer 58P, marca Mahr acoplado com apalpador mecânico FRW-750 com ponta cônica de diamante, tendo um raio de ponta de $10\mu\text{m}$ e ângulo de ponta 90° e alta resolução, que permitiu avaliar a rugosidade de superfície dos implantes.

O equipamento pertence ao LASUS – Laboratório de Análise de Superfícies Usinadas – GRUCON – CT – UFSC (FIG.1, 2, 3, 4).

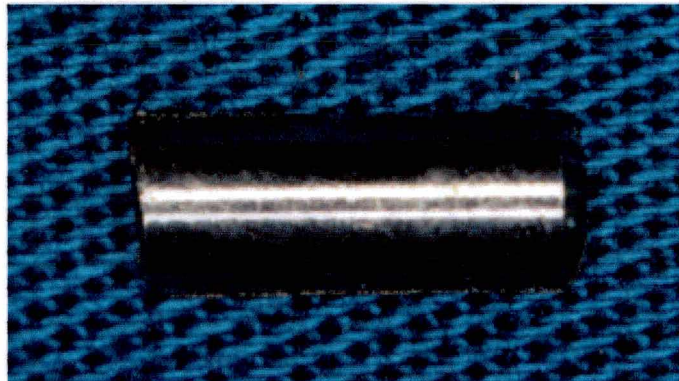


Figura 1 – Amostra do implante do Grupo 1 ($f = 0,05\text{mm}$)

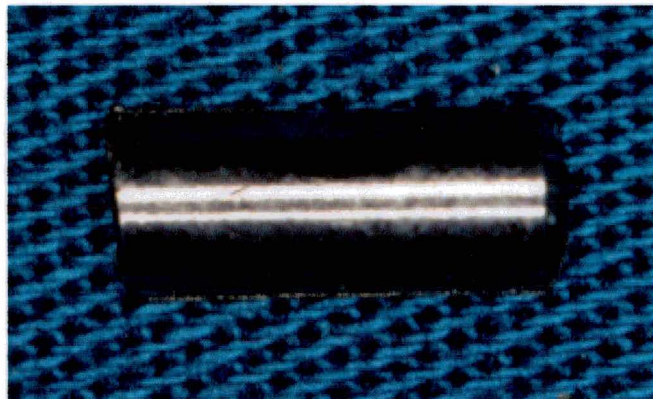


Figura 2 – Amostra do implante do Grupo 2 ($f = 0,1\text{ mm}$)

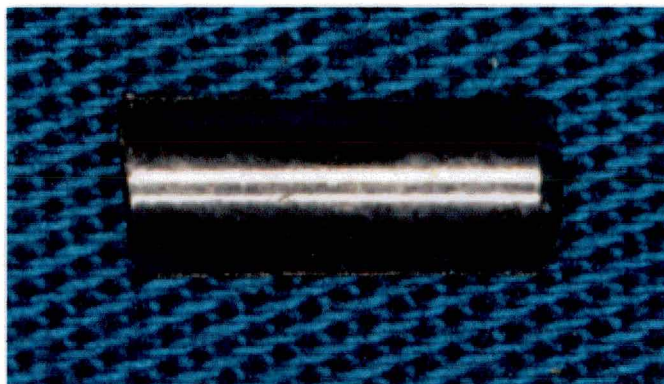


Figura 3 – Amostra do implante do Grupo 3 ($f = 0,13$ mm)

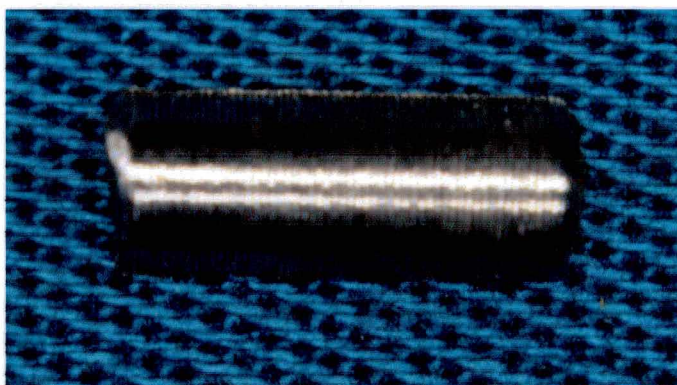


Figura 4 – Amostra do implante do Grupo 4 ($f = 0,15$ mm)

4.1.6 Seleção e determinação dos grupos experimentais

Os implantes foram desenvolvidos com o intuito de produzir, quantificar e otimizar a geometria da superfície mais adequada por meio da técnica de usinagem de natureza experimental. As amostras enquadram-se nos resultados de textura da superfície semelhante as encontradas nas pesquisas biológicas que se referem à proliferação e diferenciação celular para a consolidação de implantes osseointegrados (BOWERS et al., 1992; MARTIN et al., 1995; GOTLANDER et al., 1997; DALTON et al., 2001; SCHMIDT, IGNATIUS, CLAES, 2001).

4.1.7 Fabricação dos implantes - Usinagem

A barra cilíndrica foi fixada ao torno com ajuda de dispositivos de fixação criado no USICON. Seleccionadas e preparadas as ferramentas e o regime de uso do torno – Programa CMC (que é ajustado para obtenção de acabamento de acordo com os manuais de ferramentas comerciais e prática da usinagem de metais), realizou-se a usinagem. Desta forma, conseguiu-se diferentes texturas sobre a superfície dos implantes que foram influenciadas pelo desgaste das ferramentas, vibração do sistema de usinagem e pelo acúmulo de calor gerado durante a manufatura. (TAB. 2).

Tabela 2 – Condições de usinagem utilizadas no torneamento dos grupos experimentais.

| Grupos | Qt. de amostras por grupo | (mm) Avanço (F) | Velocidade de Corte (Vc) (m/min) | Profundidade de corte (ap) (mm) | (mm) Raio de Quina (re) | Material | Material da Ferramenta Classe | Tipo de Fluido de Corte |
|--------|---------------------------|-----------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------|----------|-------------------------------|-------------------------|
| 1 | 8 | 0,05 | 40 | 0,1 | 0,2 | Ti c.p. | H13A | Óleo solúvel |
| 2 | 8 | 0,10 | 40 | 0,1 | 0,2 | Ti c.p. | H13A | Óleo solúvel |
| 3 | 8 | 0,13 | 40 | 0,1 | 0,2 | Ti c.p. | H13A | Óleo solúvel |
| 4 | 8 | 0,15 | 40 | 0,1 | 0,2 | Ti c.p. | H13A | Óleo solúvel |

Todos os implantes Ti c.p. foram torneados (usinados) nas seguintes condições: velocidade de corte (V_c) de 40 m/min, profundidade de corte (ap) de 0,1mm, raio de quina da ferramenta (r_e) de 0,2mm, com material de ferramenta classe H13A em óleo solúvel.

Modificou-se apenas o avanço (f) da ferramenta em 0,05mm, 0,10mm, 0,13mm e 0,15mm, conseguindo-se assim com esta variável 4 grupos de implantes com textura superficiais rugosas e distintas.

4.1.8 Parâmetros de rugosidade

A rugosidade resultante na superfície dos implantes de Ti c.p. foi medida com rugosímetro e interpretada estatisticamente. Utilizou-se parâmetros verticais conhecidos R_a , R_z e R_t , expressos em μm , para avaliar a rugosidade produzida, uma vez que os mesmos têm produzido informações relevantes na área de superfícies para implantes dentais. A R_a é a média aritmética das alturas das rugosidades. A R_z (R_{tm}) é a média de cinco valores consecutivos nas alturas dos picos-vale e a R_t é a distância entre o maior pico e o vale mais profundo detectado na amostra.

4.1.9 Análise estatística

Para análise estatística foram utilizados o teste de Scheffé ($p < 0,01$) para comparações individuais e análise de variância (ANOVA) para comparação de rugosidade entre os 4 grupos experimentais das medidas R_a , R_z e R_t .

4.1.10 Resultados

1. Os implantes Ti c.p. usinados a serem testados em cultura de células osteoprogenitoras e osteoblásticas apresentam uma topografia (textura) superficial rugosa reproduzida dentro de parâmetros de rugosidade encontrados na literatura com reconhecida capacidade para osteointegração.
2. Alterações nos parâmetros de corte, proporcionado pela alteração apenas no avanço da ferramenta mostrou haver interdependência entre outros parâmetros de rugosidade e possibilidade de se manipular a rugosidade da superfície usinada numa ampla faixa.
3. O uso do $f = 0,05\text{mm}$ (Grupo 1), $f = 0,1\text{mm}$ (Grupo 2), $f = 0,13\text{mm}$ (Grupo 3), $f = 0,15\text{mm}$ (Grupo 4) produziram rugosidades R_a média igual à $0,5\mu\text{m}$, $1,4\mu\text{m}$,

2,2 μ m e 3,2 μ m respectivamente, sendo os grupos 2 e 3 mais representativos quanto à resposta biológica.

4. Das quatro superfícies de Ti c.p. usinadas mecanicamente, três apresentaram valores dos parâmetros de rugosidade R_a , R_z e R_t , com comportamento calculável e reproduzível quando medido pelo rugosímetro (Grupos 2, 3, 4).
5. No grupo 1 onde a superfície foi estabelecida com uma V_c de 40m/min e f de 0,05mm, a correlação entre os parâmetros de rugosidade R_a , R_z e R_t foram desproporcionais, não havendo uma homogeneidade e reprodutividade entre os valores fornecido pelo uso de rugosímetro. Acredita-se que avanços baixos em torno de 0,05mm promovem um amassamento das pequenas irregularidades que foram muito próximas entre si.

Obs.: Estes resultados citados acima foram obtidos do trabalho de Togaschi (2001).

4.2 Proposta protocolar para avaliar *in vitro* o crescimento e adesão celulares frente a implantes de Ti c.p. com quatro texturas superficiais, obtidas por usinagem

4.2.1 Limpeza e remoção de contaminantes dos implantes

No processo de fabricação a superfície do metal de implante está sujeita a contaminação por detritos orgânicos e inorgânicos. Antes de colocar os implantes em meio de cultura de células osteoprogenitoras e osteoblastos necessário se faz, uma limpeza buscando eliminar estes contaminantes.

Propomos o protocolo preconizado pela Faculdade de Odontologia de Bauru (USP) – São Paulo:

1. lavagem com tricloroetileno por 10min em ultrasom;
2. duas lavagens em álcool absoluto por 10min em ultrasom;

3. remoção das rebarbas de usinagem com auxílio de uma lupa com aumento máximo de 40 vezes.
4. lavagem com tricloroetileno por 10min em ultrassom;
5. duas lavagens com álcool absoluto por 10min em ultrassom;
6. três lavagens com água deionizada e bidestilada;
7. lavagem com tricloroetileno por 10min em ultrassom;
8. duas lavagens com álcool absoluto por 10min em ultrassom;
9. secagem no ar;
10. passivação em estufa a 180°C por 30 min.;
11. colocação dos implantes em ampolas de vidro contendo Lauril a 2% ou álcool etílico a 10%;
12. esterilização em autoclave a 121°C por 20min.

4.2.2 Doadores de tecido ósseo córtico-trabecular para obtenção de células osteoprogenitoras e osteoblásticas

Remover com uma trefina o tecido ósseo córtico-esponjoso de cavidade bucal de pacientes que se submeterão a remoção cirúrgica de dentes retidos (FIG. 5).

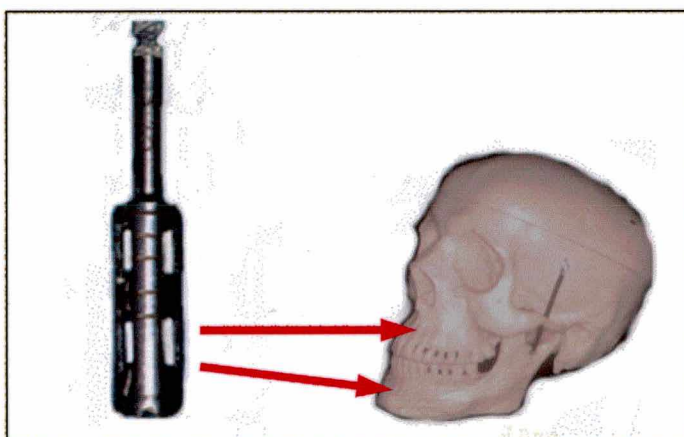


Figura 5 – Trefina para remoção óssea dos maxilares

Acondicionar o tecido ósseo coletado em um recipiente de vidro contendo meio de cultura nutriente fresco (DME 89% + Soro fetal bovino 10% + solução antibiótica estreptomicina/penicilina 1%, na concentração de 300U/ml) (DEBONI; JAEGER; ARAUJO, 1996). A solução antibiótica se adquire já pronta, em solução estoque contendo 5000U/ml de penicilina e 5000 U/ml de estreptomicina (LINKERS et al., 1998) (FIG. 6).

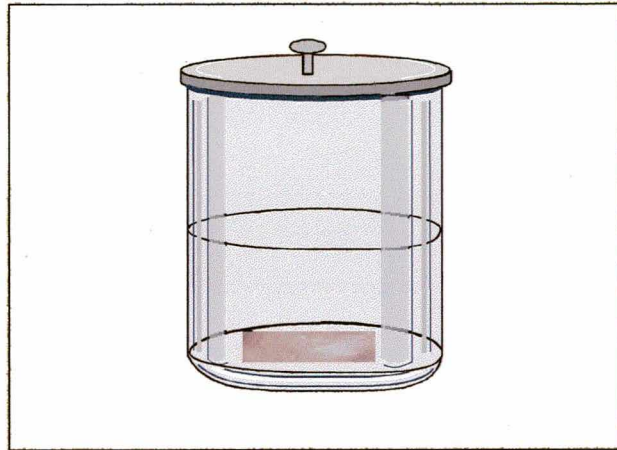


Figura 6 – Recipiente de vidro para armazenar tecido ósseo maxilar no meio de cultura nutriente: DME 89% + PFB 10% + Sol. antib. penicilina/estreptomicina 300U/ml/1%

Cabe esclarecer aqui, que Li; Liu; Wu (2001) utilizaram DMEM + 10% de FBS + 40µg/ml de ácido ascórbico (Vit. C).

4.2.2.1 Obtenção de linhagem de células osteoprogenitoras e osteoblásticas. Procedimentos laboratoriais para isolamento e cultivo

Refragmentar, em laboratório, os fragmentos de tecido ósseo sob capela de fluxo laminar ou alternativamente com titurador ósseo utilizado para enxertos ósseos particulados (FIG. 7).



Figura 7 – Tritador ósseo (R. Quetin)

Transferir o tecido ósseo refragmentado para tubos de centrifugação contendo solução de tripsina 0,25% em PBS, para serem submetidos à digestão enzimática e a dissociação mecânica através do uso de pipetas Pasteur.

Executar cinco passagens na solução enzimática (tripsinizações) por um período de 5min cada e neutralizar com meio de cultivo (DME) contendo soro fetal bovino. Estas tripsinizações dissolvem a fase inorgânica (mineral) do tecido ósseo, permanecendo intacta a fase orgânica (células). (FIG. 8)

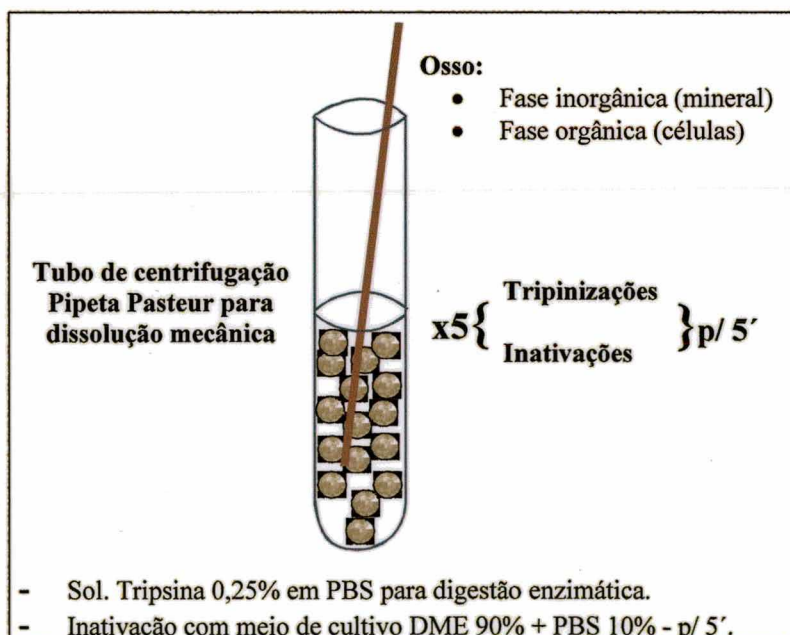


Figura 8 – Materiais utilizados para isolamento e cultivo celular

Centrifugar a suspensão de células obtida a 100g por 10min. O precipitado de células é ressuspendido em meio de cultura fresco. Distribuir a nova suspensão de células, produto do conjunto das cinco tripsinizações e inativações mais a centrifugação, em placas Petri de cultura e manter em meio Eagle modificado por Dulbecco (DME) com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica, em estufa a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 95% ar e 5% CO₂ (FIG. 9A, 9B, 9C, 9D e 9E).

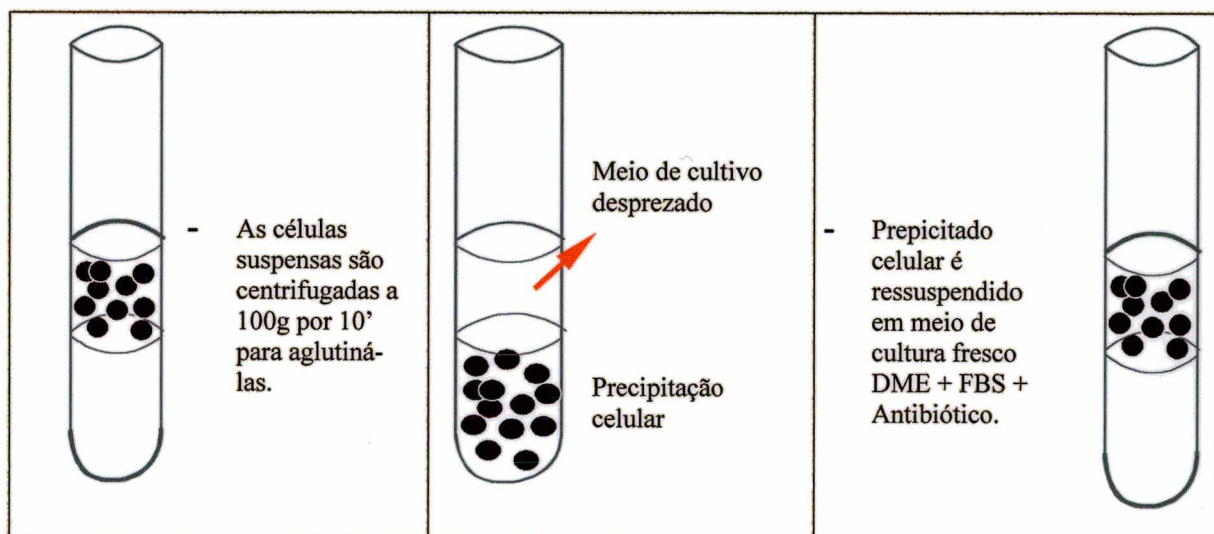


Figura 9A, 9B, 9C, 9D, 9E – Materiais utilizados para isolamento e cultivo celular

4.2.2.2 Observação do crescimento celular

Realizar a observação do crescimento celular a cada 24h utilizando-se microscópio de fase invertido. Trocar, para manutenção das células, o meio de cultivo de 48h/48h (DME + FBS + Solução Antibiótica). No experimento de Deboni; Jaeger; Araújo, 1996 logo após o plaqueamento (placas Petri) pode-se observar as células obtidas com características arredondadas (FIG. 10A) (63x).

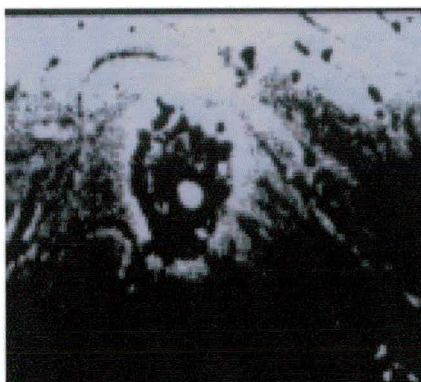


Figura 10A – Sub-cultura de células obtidas a partir da dispersão enzimática de células da cálcia de ratos recém-nascidos no experimento de Deboni; Jaeger; Araujo (1996).

Após 3 a 4 dias das células aderem-se ao plástico dos frascos de cultivo assumindo características fusiformes lembrando morfologia de fibroblastos (FIG. 10B). (63x) (DEBONI; JAEGER; ARAÚJO, 1996).

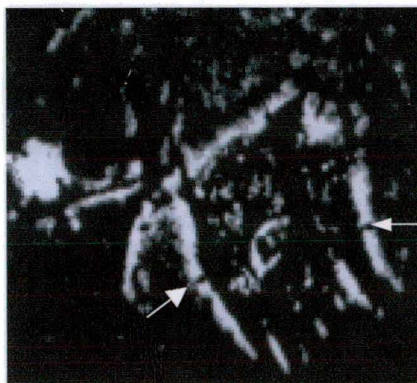


Figura 10B – Sub-cultura de células obtidas a partir da dispersão enzimática de células da cálcia de ratos recém-nascidos no experimento de Deboni; Jaeger; Araujo (1996).

Após 4 a 7 dias as células adquiriram aspecto poligonal com citoplasma bastante granular (FIG. 10C). (Microscopia de fase invertido 100x) (DEBONI; JAEGER; ARAÚJO, 1996).

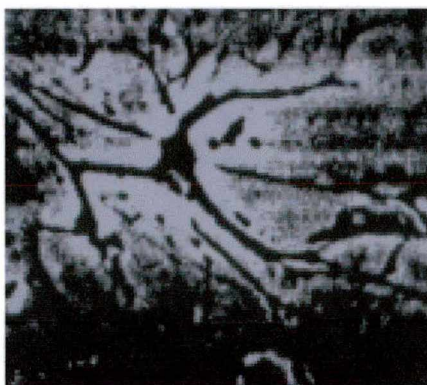


Figura 10C – Sub-cultura de células obtidas a partir da dispersão enzimática de células da cálcia de ratos recém-nascidos no experimento de Deboni; Jaeger; Araujo (1996).

A cultura deve atingir a semiconfluência por volta do 10º ao 15º dia mostrando células bem agrupadas exibindo núcleos grandes e interdigitações citoplasmáticas (FIG. 10D) (100x) (DEBONI; GAEGER, ARAÚJO, 1996).



Figura 10D – Sub-cultura de células obtidas a partir da dispersão enzimática de células da cálcia de ratos recém-nascidos no experimento de Deboni; Jaeger; Araujo (1996).

No período de semiconfluência a cultura deve apresentar-se firmemente aderida ao frasco de cultivo tanto que, para dispersar essas células necessário se faz o uso de solução

Versene (Tripsina 0,25% + Ácido Etilenodiaminotetracético – EDTA – Instituto Adolfo Lutz), pois as células não se desprendem facilmente do frasco e em geral soltam-se na forma de lençóis de células aderidas umas às outras (DEBONI; JAEGER; ARAUJO, 1996).

4.2.2.3 Indução do fenótipo osteoblástico

Por volta do 11^o ao 16^o dia, ou seja, logo após a semiconfluência, realizar a sub-cultura. Separar as células por tripsizações utilizando solução de tripsina 0,25% em PBS por 3 a 5min à temperatura ambiente.

Após a inativação da tripsina com meio contendo soro fetal bovino (FBS) em um tubo de ensaio, centrifugar a 300g por 5min a suspensão de células e o precipitado é ressuscitado em meio de cultura básico fresco (89% DME + 10% Soro fetal bovino – FBS e 1% solução antibiótica estreptomicina/penicilina 300U/ml) (FIG. 11A, 11B, 11C).

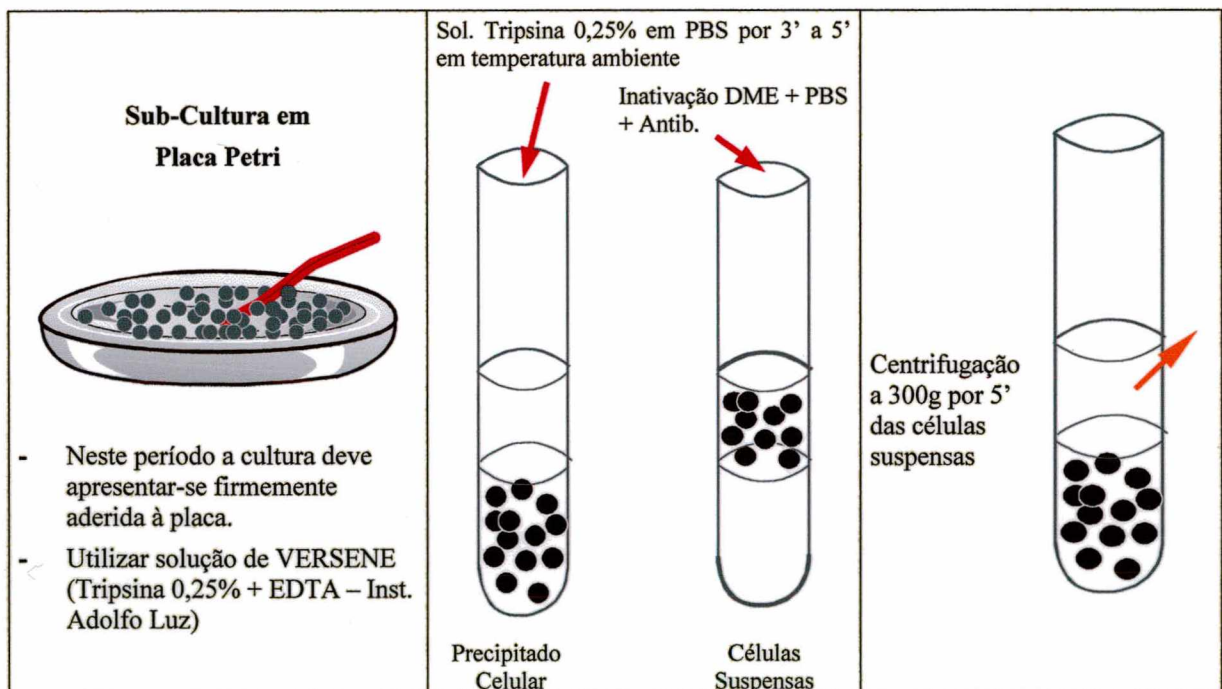


Figura 11A, 11B, 11C – Materiais utilizados para isolamento do cultivo celular

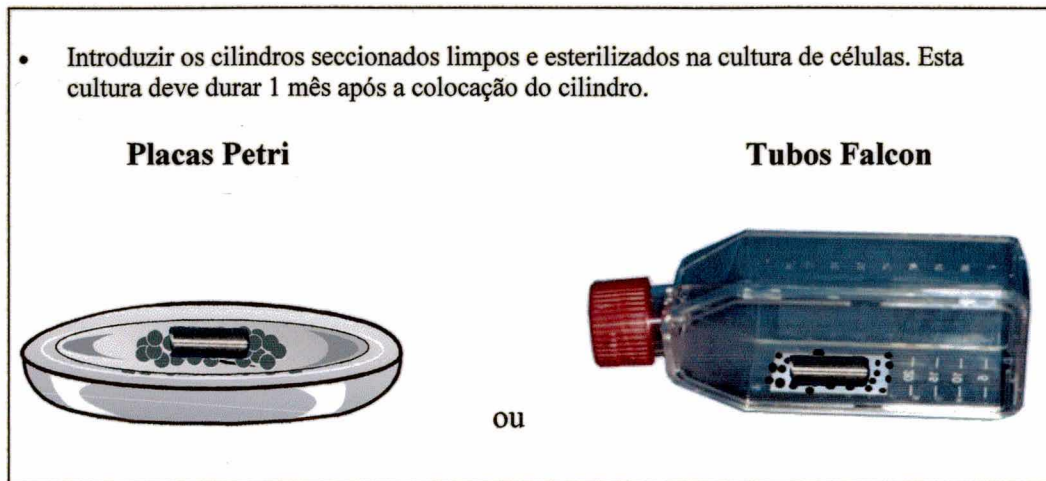


Figura 11E – Cilindros de titânio seccionados estéreis colocados na sub-cultura de células osteoblásticas confluentes (16° ao 22° HA).

Do 22° ao 29° dia devem ser observados (nas regiões de células que estarão mais agrupadas) o aparecimento de estruturas modulares, às vezes lembrando osso imaturo (FIG. 12A). (Microscopia de Fase 100X) (DEBONI; JAEGER; ARAÚJO, 1996).

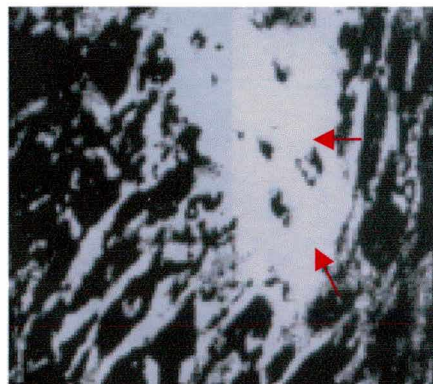


Figura 12A – Sub-cultura de células obtidas a partir da dispersão enzimática de células da calvaria de ratos recém-nascidos no experimento de Deboni; Jaeger; Araujo (1996).

Em culturas mais velhas (com mais de 40 dias), por vezes, poderá ser visto células pequenas estreladas com processos citoplasmáticos finos e longos, lembrando a morfologia típica de osteócitos *in vivo* (FIG. 12B). (Microscopia de Fase 100X) (DEBONI; JAEGER; ARAÚJO, 1996).

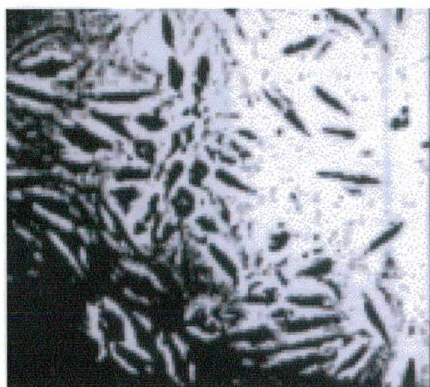
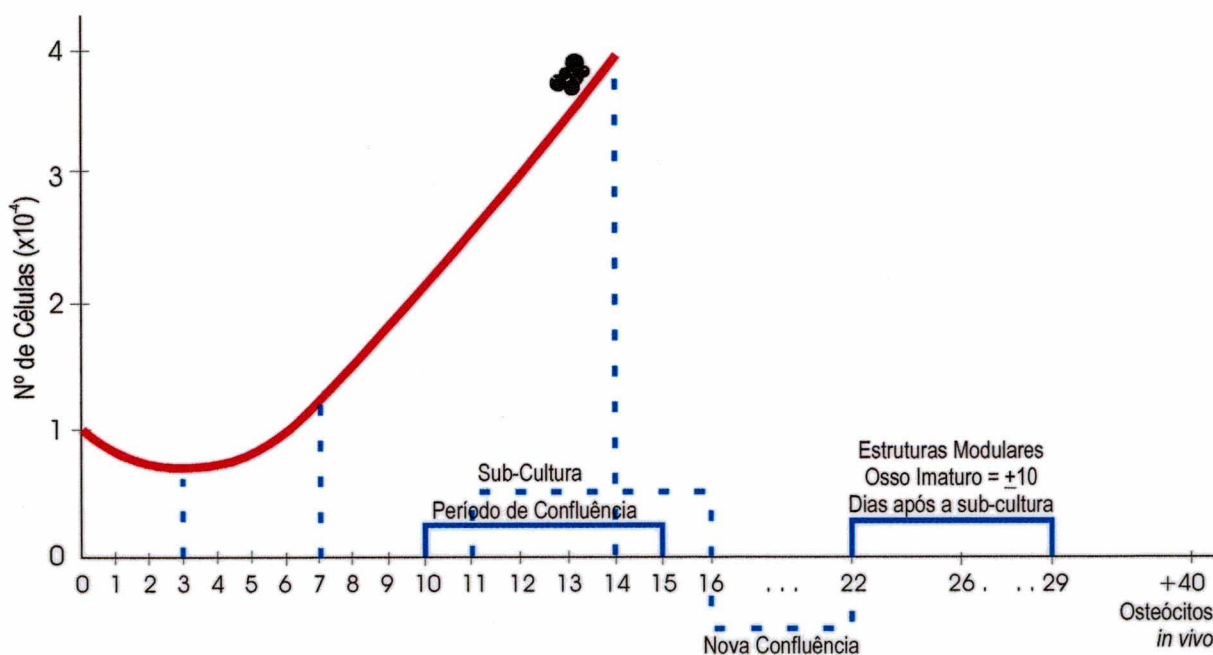


Figura 12B – Sub-cultura de células obtidas a partir da dispersão enzimática de células da calvária de ratos recém-nascidos no experimento de Deboni; Jaeger; Araujo (1996).

4.2.2.4 Curva de crescimento celular



- Tempo (dias)
- Visualização em microscópio fase invertido
 - 0 = céls. calvária de ratos recém-nascidos ou humanos (aborto legal após 6 meses)
 - 0 a 3 dias = céls. características arredondadas (Fig 10A - 63x)
 - 4 a 3 dias = adesão ao plástico dos frascos de cultivo – caract. Fusiforme lembrando fibroblastos (Fig 10b - 63x)
 - 4 a 7 dias = céls. adquirem aspecto poligonal com citoplasma granular (Fig 10c) (100x)
 - 10 a 15 dias = Período de confluência – céls. agrupadas com núcleos grandes e interdigitações citoplasmáticas (Fig 10d) (100x).
 - 11 a 16 dias = sub-cultura
 - 16 a 22 dias = nova confluência – céls. Poligonais em multicamadas citoplasmaticamente granuloso recobertas por densa matriz extracelular (Fig. 12A).
 - 22 a 29 dias = aparecimento de estruturas modulares lembrando, as vezes, osso imaturo (Fig 1f)
 - + 40 dias = céls. estreladas – com processos citoplasmáticos longos e finos lembrando morfologia típica dos osteócitos *in vivo* (Fig. 12B)

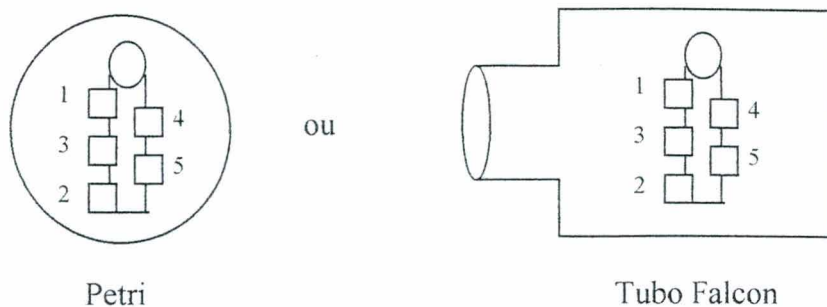
Foi observado que a cultura de células osteoprogenitoras e os osteoblastos derivados da calvária de ratos recém nascidos (DEBONI; JAEGGER; ARAUJO, 1996) e calvária de fetos humanos de 6 meses de idade, após aborto legal (LI; LIU; WU, 2001) apresentaram um tempo de duplicação do número de células no meio de cultura no período de 7 dias. Após atingir a confluência e ser realizada a sub-cultura, 7 a 14 dias nova camada celular confluenta foi formada.

Baseado nos experimentos descritos, propomos fazer uma cultura proveniente de células de tecido ósseo maxilares (córtico-esponjoso). Após atingir a confluência, realizar a sub-cultura para formação de nova camada celular confluenta em analogia com os estudos supra-mencionados. Poderá haver diferença no período de formação da camada celular confluenta.

Colocar os cilindros de titânio seccionados previamente esterilizados e limpos conforme protocolo preconizado pela USP, sobre a camada celular confluenta formada no meio de cultura. Para tanto deve-se utilizar uma pinça de titânio previamente esterilizada de preferência com a mesma composição química dos cilindros testes seccionados. O meio de cultura deve ser trocado de 48 a 48h com devido cuidado no sentido de evitar contaminação e movimentação dos semicilindros. A cultura deve durar um mês após colocação dos cilindros seccionados.

4.2.2.5 Observação com contraste de fase invertida

Já no primeiro dia, após a semi-confluência da sub-cultura, as células da camada celular devem continuar a multiplicar-se, migrar e se fixar em direção à superfície semicircunferencial dos cilindros de Ti, mostrando não apresentar inibição por contato. Posteriormente, a migração e fixação das células deve aumentar e uma interface tridimensional entre o cilindro seccionado de Ti deve se formar. A área refratária em volta dos semi-cilindros em cinco pontos previamente estabelecidos conforme esquema a seguir, devem ser observados através de microscópio óptico de contraste de fase invertida com aumento mínimo de 40X.



Propomos para leitura as seguintes posições no semicilindro de Ti colocado no meio de cultura no centro da placa de Petri ou tubos Falcon: 1ª posição – na porção mais coronal do cilindro; 2ª posição – na porção mais apical do cilindro; 3ª posição – no $\frac{1}{3}$ médio do cilindro seccionado; 4ª posição – na porção intermediária entre o $\frac{1}{3}$ cervical e $\frac{1}{3}$ médio do cilindro e 5ª posição – na porção intermediária entre o $\frac{1}{3}$ apical e $\frac{1}{3}$ médio do cilindro. Estas posições fixas previamente selecionadas evitam a tentação de se realizar leitura no microscópio de fase invertida somente nas áreas em que ocorrerem melhor crescimento e adesão celular e, conseqüentemente, evitam a publicação de falsos resultados.

A observação com microscópio convencional e de fase invertida deve mostrar, já nos três primeiros dias de sub-cultura e introdução dos cilindros, bandas refratárias com brilhos diferentes. Nas áreas rugosas (+lisas) a banda refratária deverá mostrar brilho mais uniforme. Quanto mais lisa for a superfície do cilindro de Ti usinado mais uniforme será o brilho, apresentando contornos celulares de origem paralela com bordas finas e regulares. Quanto mais rugosa for a superfície da amostra, a banda refratária será de um brilho menos uniforme apresentando contornos regulares de origem perpendicular com bordas irregulares (LI; LIU; WU, 2001) (FIG. 13A e 13B).

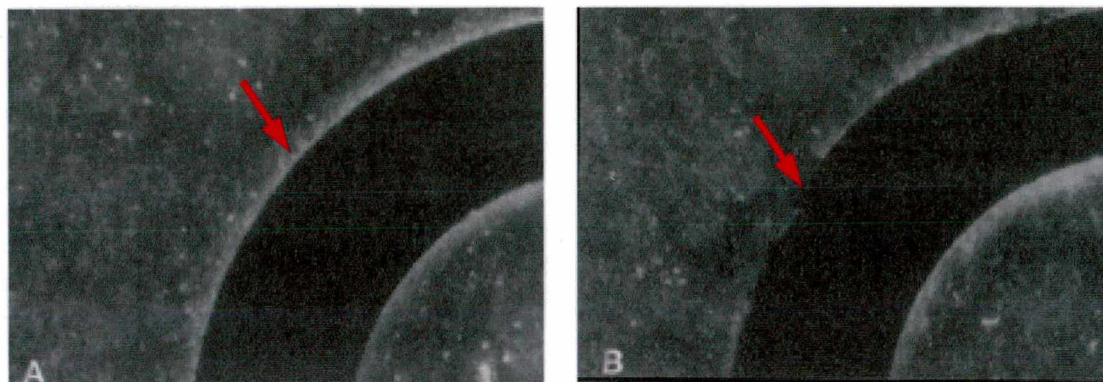


Figura 13A e 13B - Discos de titânio em sub-cultura de células obtidas a partir da dispersão enzimática de células da calvária de fetos humanos de 6 meses de idade, após aborto legal

Esta orientação celular paralela ou perpendicular na superfície do Ti deve ser observada em grande aumento 400X (LI; LIU; WU, 2001) (FIG. 14A e 14B).

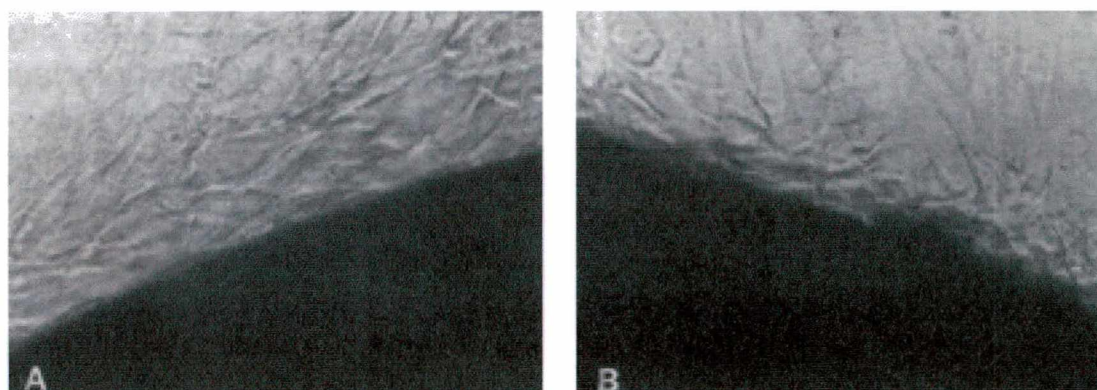


Figura 13A e 13B - Discos de titânio em sub-cultura de células obtidas a partir da dispersão enzimática de células da calvária de fetos humanos de 6 meses de idade, após aborto legal

As células fixadas paralelamente à superfície mais lisa devem mostrar-se em forma de fuso, alongadas, enquanto as fixadas perpendicularmente a superfície mais rugosa deverão mostrar-se de forma triangular ou multi-anguladas.

Após, aproximadamente, sete dias de cultura, as células de orientação e fixação devem aumentar e a banda refratária, tornar-se mais larga e brilhante.

A performance de cada grupo deve ser similar àquela do terceiro dia e as diferenças entre os quatro grupos deverão mostrar-se mantidas e até mesmo expandidas.

5 RESULTADOS

A Universidade Federal de Santa Catarina, confeccionou, num trabalho conjunto entre o Centro de Estudo de Pesquisa em Implantes Dentários e o Departamento de Engenharia de Materiais, implantes odontológicos de titânio comercialmente puro (Ti c.p.).

Estes implantes, com diferentes topografias de superfície (rugosidade) foram desenvolvidos visando ser capazes de favorecer a osteointegração com o objetivo de serem aplicados na reabilitação bucal.

Para a verificação do comportamento celular junto aos implantes tornava-se indispensável analisar e comparar o comportamento celular-crescimento e adesão – considerando-os frente às quatro diferentes rugosidades na superfície dos implantes.

Em termos de resultados a serem apresentados, temos a expor que não iremos apresentá-los, tal como seria esperado, em uma experiência laboratorial completa.

Para desenvolver o trabalho, não foi possível contar com laboratórios equipados nem corpo técnico capacitado e disponível para tal fim, após ter consultado a própria Universidade Federal de Santa Catarina e o laboratório independente de pesquisa denominado Neurogene, cuja experiência restringia-se a fibroblasto de placenta.

Partiu-se então para formular um protocolo biológico, de cultura de células osteoblásticas para avaliar *in vitro*, a topografia de superfície (rugosidade) dos implantes odontológicos obtidos por usinagem.

Pode-se apenas adiantar, como resultados esperados, que os cilindros do grupo 2 com $Ra=1,4\mu m$ e do grupo 3 com $Ra=2,2\mu m$ sejam os mais representativos quanto à resposta biológica, tendo por base para tal afirmação os resultados de trabalhos anteriores e que serviram de referencial teórico para este trabalho, conforme resultados de textura da superfície semelhante às encontradas nas pesquisas biológicas que se referem à proliferação e diferenciação celular para a consolidação de implantes osseointegrados.

Para aferição dos resultados, os dados serão analisados utilizando-se testes estatísticos de análise de variância (Anova), acrescido de estatística descritiva para comparar o número de inserções de osteoblastos em cada grupo.

6 DISCUSSÃO

Um implante projetado com características de superfície próprias através de usinagem foi fabricado na Universidade Federal de Santa Catarina, esperando que sua topografia superficial seja capaz de obter resposta biológica positiva.

O sucesso de um implante é diretamente dependente do tipo de interface biomaterial-osso obtida após sua implantação. A osseointegração é uma união do implante ao tecido ósseo, com a presença de uma interface clinicamente rígida. Contudo, histologicamente, não há um consenso quanto ao nível de resolução e quantificação necessária ao grau do contato direto osso-implante para chamar um implante de osteointegrado. Em função disto, atualmente, uma definição clínica é mais útil e a melhor parece ser aquela proposta por Albrektsson et al. (1981). Os autores definiram osteointegração como: “*um processo aonde uma fixação rígida e assintomática é obtida com materiais aloplásticos e mantida no osso durante a aplicação de cargas funcionais*”. Devemos separar o desempenho clínico do implante da necessidade existente de respostas ultra-estruturais apesar de serem partes integrantes da ocorrência da osteointegração. Clinicamente, dizemos que estão osteointegrados aqueles implantes que se apresentam estáveis, sem mobilidade; os instáveis normalmente estão envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, apresentando certo grau de mobilidade.

Sobre osteointegração, Albrektsson e Sennerby (1990) dizem que no presente momento nos falta uma definição aceitável do termo osteointegração, pois biologicamente a mesma foi insuficientemente investigada. A conexão entre osso-implante se forma por ligações estáveis, das quais não dispomos de suficiente conhecimento.

Albrektsson e Jacobsson (1987) afirmaram que, para um implante ser considerado osseointegrado, deve possuir no mínimo 90% a 95% de contato com o osso cortical, após pelo menos 1 ano de função. Com a utilização de aparatos microscópicos acoplados a microcâmeras e computadores é possível quantificar a porcentagem de osteointegração.

Porém, a microscopia responde se a maioria da superfície do implante está ou não em contato com o tecido ósseo.

Albrektsson e Sennerby (1991) melhor ancoragem no osso tem sido conseguida, pelo uso de implantes de titânio com superfície rugosa, texturizada ou com cobertura de tricálcio fosfato, porém a superfície ideal para a função clínica a longo prazo necessita ainda ser definida.

Em relação a macroestrutura do implante é quase aceitação universal de que os implantes em forma de parafuso são superiores às demais tendo Campos Jr.; Pazanezi, 1996 apresentado as vantagens desta forma geométrica.

Albrektsson et al. (1981) propuseram o controle de seis parâmetros para o sucesso dos implantes odontológicos, quais sejam: biocompatibilidade do material, estado do sítio receptor, técnica cirúrgica, condições de carga, macroestrutura e microestrutura do implante. A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material interagir com uma resposta apropriada do hospedeiro. Piatteli; Trisi; Emanuelli (1993) alegam ser o biomaterial ideal, aquele que é verdadeiramente integrado ao novo osso, com ausência de todos os tipos de reação de proteção.

A escolha do metal neste processo é de fundamental importância para o sucesso do projeto de implante dental. A maioria dos metais usados para aplicações biomédicas exigem uma superfície policristalina (mosaico de microcristais orientados aleatoriamente) onde é possível encontrar defeitos associados com os cristais (torções e passo) que podem ser altamente reativos induzindo alteração protéica e reação celular. Rugosidade de superfície resultante dos defeitos cristalinos pode beneficiar a biocompatibilidade, dependendo do sítio implantado; no osso a distribuição do estresse ocorrerão sobre uma área mais ampla proporcionado pela rugosidade de superfície do implante. A valência do metal influencia a interação biológica-material. Superfícies de implantes estão sujeitos a corrosão como resultado do contato com fluidos corporais eletrolíticos e ela aumenta se o implante está em função oclusal. A corrosão muda a natureza da superfície, a resistência e outras propriedades mecânicas do material, como também pode afetar tecidos circunvizinhos induzindo reação sistêmica (RATNER; JOHNSTON; LENK, 1987).

Vários metais e ligas metálicas usadas para fabricação de implantes bucais têm produzido reações teciduais adversas e sua baixa taxa de sucesso diminui sua aplicabilidade

clínica a longo prazo. Na indústria de implantes dentais muitos dos metais e ligas metálicas, tais como ouro, aço inoxidável, cromo-cobalto, são considerados obsoletos, (SYKARAS et al., 2000).

Albrektsson et al. (1981); Piatteli; Trisi; Emanuelli (1993); Martin et al. (1995) dizem ser o titânio por sua aceitação biológica no osso o material de escolha para confecção de implantes. O efeito adverso do titânio é baixo, pois o metal é inerte pela imediata formação de uma camada de óxido de superfície durante a manufatura. As propriedades químicas e a interface química são determinadas por esta camada de óxido e não pelo metal em si.

Ainda não estão totalmente bem entendidos os fatores e mecanismos da resposta biológica ao titânio, apesar da sua utilização por mais de 30 anos em diferentes aplicações. O fator importante do titânio que merece destaque são as propriedades do óxido de superfície. A cicatrização óssea não começa na superfície do implante de titânio usinado, mas sim, ao seu redor por um processo de mineralização gradual que é guiada. A superfície de titânio usinada pode ser considerada como uma superfície permissiva para a mineralização óssea gradual, mas não como indutora de formação óssea. Durante a fase de cicatrização e remodelação óssea, processos biológicos na interface podem afetar as propriedades do óxido de superfície. Estudos de implantes metálicos removidos, incluindo o titânio tem indicado que a espessura da camada de óxido aumenta com o tempo e que elementos como íons cálcio, fósforo e enxofre do ambiente fisiológico são incorporados ao óxido (LARSSON et al., 1996).

Com possível exceção ao ouro, todos os metais quando exposto ao ar adquirem filmes de óxido tipo cerâmico em suas superfícies. Estas camadas de óxido podem influenciar proteínas e reações celulares ao redor do material. Óxidos com constante dielétrica alta tem mostrado retardar o movimento das células em torno da superfície em ambiente aquoso e causar menos desnaturação das proteínas que superfície com baixa constante dielétrica. O titânio forma um óxido estável com alta constante dielétrica e exhibe íntima ligação com o osso, (RATNER; JOHNSTON; LENK, 1987).

Kasemo (1983) esclarece que à exceção ao ouro e platina, as propriedades químicas, ligações e processos químicos na interface metal biotecido são determinados pela camada de óxido na superfície do metal e não pelo próprio metal em si. Esta interface seria representada pelas camadas de óxido do titânio, condroitin sulfatase e colágeno. O titânio pode ser visto como um material que apresenta propriedade mecânica do metal combinada com propriedades

químicas do óxido do metal. Implantes de titânio sob o ponto de vista bioquímico poderiam ser considerados como óxidos cerâmicos. O tecido ósseo ao redor do implante osseointegrado não interage com o metal, mas com seu óxido numa interação física e química. Observou-se que a camada de óxido de titânio é autopassiva e pode não ser estática, pois na interação tecidual ocorre aumento da espessura do óxido ao longo do tempo em períodos de 6 a 7 anos ou mais. O titânio forma vários óxidos estáveis com alta constante dielétrica tais como: TiO , TiO_2 , Ti_2O_3 e Ti_3O_4 , sendo o TiO_2 o mais prevalente. A primeira camada monomolecular de biomoléculas que se liga ao óxido de superfície ainda não foi elucidada. Forças de adesão (1 a 10Kcal/mol) são tão pequenas que a união química permanente não consegue se estabelecer na temperatura corpórea. Se este tipo de ligação é dominante, existe uma contínua e rápida mudança das biomoléculas que aderem à superfície. Moléculas de água modificam a forma de ligação e estabelecem a ligação. A força de ligação é determinada por parâmetros físicos como a ligação de Van der Waals, a constante dielétrica da superfície do implante e a polaridade da molécula ou grupo radical que se liga a superfície. Dentro da grande variação de forças e dos tipos de ligações químicas que a superfície do óxido metálico oferece algumas destas serão irreversíveis e outras caracterizadas por contínuas trocas de moléculas dentro de um equilíbrio dinâmico. A alta constante dielétrica dos óxidos de titânio pode ser o fator crucial que se distingue o titânio de outros metais de implante. Nos processos de usinagem dos implantes, o metal titânio é exposto ao ar atmosférico, lubrificantes e soluções irrigadoras. A exposição ao ar resulta em rápida formação de óxido de superfície que em menos de milionésimos de segundo pode ser maior do que 10Å e em 1min pode atingir 50Å a 100Å. A espessura, composição e microestrutura do óxido dependerá de vários fatores, incluindo a pressão e a velocidade de fabricação que determina a temperatura da superfície. Portanto, consideráveis variações nas propriedades da superfície, como a camada de óxido, podem ser esperadas com diferentes condições de fabricação. A espessura da camada de óxido aumenta muito mais rapidamente no sítio ósseo do que na exposição ao ar atmosférico. Este aumento é decorrente da difusão de átomos/ion do metal para a camada de óxido de superfície, seguido pela oxidação, ou pela difusão de átomos de oxigênio dos carregadores (moléculas de O_2 e H_2O) do meio (tecidos biológicos e/ou ar atmosférico) para o interior da camada óxida. Como resultado da participação de átomos de hidrogênio (ou prótons), o óxido podem também crescer pela formação do hidróxido, como indicado pelo radical hidroxila (OH). Outros componentes como óxidos de ions minerais de cálcio e fósforo pode contribuir para o crescimento e modificação da camada óxida. A possibilidade de corrosão sugere o potencial de dissolução da camada de óxido protetora, fato este que pode ser um severo problema com

alguns materiais utilizados para implantes. No titânio este processo parece ser muito lento, provavelmente, devido a alta estabilidade de seu óxido. Entretanto são necessárias mensurações quantitativas da taxa de corrosão a longo prazo. A força da ligação entre as biomoléculas e a superfície determina a substituição ou não das biomoléculas. A hidratação do óxido é outro processo de possível ocorrência e pode ser importante no estabelecimento de adequado ambiente químico para as biomoléculas. A natureza do óxido de superfície sobre o Ti c.p. e liga de Ti parecem semelhantes, mas com algumas diferenças que podem ter implicações biológicas (KASEMO, 1983).

O Ti c.p. e liga de titânio, o óxido predominante na superfície foi o TiO_2 com presença de contaminantes como oxigênio, carbono e nitrogênio e ocasionalmente foram observados sobre alguns espécimes contaminantes inorgânicos como sódio, cloro, cálcio, fósforo, enxofre. Alumínio no óxido da liga de Ti foi observado, porém sua presença foi relacionada as diferenças microestruturais entre Ti c.p. (fase α e β) e liga de Ti (somente α). Em geral, vanádio não foi visto na camada de óxido da superfície da liga de titânio. Ultraestruturalmente, uma camada de proteoglicana livre de colágeno com espessura menor que 500\AA foi encontrada sobre o óxido do Ti c.p. e de $500-1000\text{\AA}$ na liga de titânio, ou seja, duas a três vezes a espessura observada no Ti c.p. implantado após três meses (KELLER et al., 1994).

Wong et al. (1995) relataram que implantes de Ti c.p., Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb jateados e rugosos não mostraram diferença (mecânica) na força de torque à remoção (morfométrica) e na porcentagem de contato ósseo à superfície do metal. Alguns autores acreditam que a composição do metal do implante tenha pouco efeito na osteointegração. Qualquer diferença na biocompatibilidade entre estes materiais não foi suficiente para resultar em mudanças mensuráveis na osteointegração.

Woodmam et al. (1984) mensuraram concentrações metálicas no organismo de macacos e observaram nível de titânio equilibrado no pulmão, sem evidências de toxicidade bioquímica e hematológica, porém não excluíram a possibilidade de efeitos tóxicos ao longo do tempo. As concentrações de alumínio no pulmão aumentaram linearmente durante o período de manutenção, podendo ser distribuída a outros tecidos. No entanto, desconhece-se o

potencial de toxicidade neurológica do alumínio. Não encontrou-se vanádio (altamente tóxico) acumulado no corpo dos animais, apenas níveis de elevação transitório no pulmão. Já Maeusli et al. (1986), encontraram aumento da concentração de vanádio nos tecidos quando foi implantado Ti-6Al-4V, provavelmente devido ao processo de corrosão.

Para Buchanan; Lee; Willians (1990), dependendo da liga empregada os implantes metálicos podem sofrer corrosão e combinações de elementos químicos que são liberados nos tecidos locais e podem ser transportados para outros locais do organismo. Os efeitos biológicos da liberação destes elementos químicos, a longo prazo, não estão completamente esclarecidos.

A capacidade do tecido ósseo hospedeiro em interagir intimamente com a superfície de Ti c.p. é um aspecto importante do fenômeno da osteointegração. Entretanto nos últimos anos, a utilização da liga de titânio (Ti-6Al-4V) se tornou popular por apresentar propriedades mecânicas superiores quando comparada ao Ti c.p.. No continente americano existe uma grande tendência no uso de ligas de titânio, como o Ti-6Al-4V devido a ocorrência de fraturas de implante. A composição do Ti c.p. consiste de 99,75% de titânio e apenas 0,25% de outros metais. Deve-se observar a proporção de ferro de 0,05%, pois se o conteúdo de Fe for 0,5% dobra a sua resistência porém como grande risco de aumentar a corrosão, se for apenas 0,005% sua resistência será diminuída (KASEMO, 1983).

Johansson et al. (1989) ultraestruturalmente encontraram uma camada de proteoglicanas de 200Å a 400Å de espessura, sem filamentos de colágeno, associada ao Ti c.p. enquanto na liga de Ti-6Al-4V a camada de proteoglicanas apresentou 5000Å de espessura sem filamento de colágeno. Deve-se considerar ainda o potencial deletério da liberação de vanádio e alumínio nos tecidos com a utilização das ligas de titânio. Assim, a maioria dos pesquisadores tem preconizado o uso de Ti c.p. e pesquisas básicas e na aplicação clínica de implantes odontológicos.

Atualmente, mais do que em qualquer momento da história da implantodontia, encontra-se no mercado uma variedade de formas, tamanho, material, textura de superfície de implantes com amplas indicações e aplicações clínicas (BRUNSKI, 1988).

Em função disto, Larsson et al. (1996) advogam que a análise da superfície do implante é de fundamental importância pois as propriedades da superfície como (topografia e rugosidade, espessura de óxido, microestrutura, composição do óxido, nível de impurezas dos

implantes de Ti) dependendo do tipo de preparação superficial utilizada, podem variar consideravelmente. Quando procedimentos de caracterização e preparação adequados são utilizados, as propriedades de superfície (composição da superfície e espessura do óxido) podem variar sobre um amplo limite de maneira sistemática mais ou menos controlada.

Teixeira (2001), o processo de texturização da superfície metálica, mais aplicados atualmente na metalurgia são: o eletroquímico, o químico e o mecânico, sendo os dois últimos mais usados em implantodontia. Por convenção, classificou-se as superfícies dos implantes em: a) lisa – superfície de implante resultante da usinagem; b) rugosa; c) porosa – superfície usinada e texturizada (geralmente por jateamento).

Kasemo (1983) afirma que as propriedades de superfície podem determinar o sucesso ou fracasso dos implantes. O autor descreveu alguns métodos experimentais que podem ser utilizados para caracterizar a interface material inorgânico-biotecido. Ao estudar rugosidade de superfície classificou-as em: a) rugosidade da superfície macroscópica e microscópica; b) rugosidade da superfície em escala atômica. Acredita-se que o papel principal da rugosidade é que ela pode melhorar a força mecânica de um implante e que a rugosidade na escala de 1µm ou maior, a união química não será afetada.

Gould, Brunette, Westbury (1981) *in vitro*, mostraram a formação de hemidesmossomos inseridos entre o titânio e células epiteliais gengivais o que indica claramente que o tecido mole da cavidade bucal aceita o óxido de titânio.

Kasemo e Lausmaa (1988), sabe-se que quando as dimensões das irregularidades e estrutura da superfície do implante se igualam em tamanho às unidades biológicas, elas influenciam a interação metal-tecido.

A topografia dos implantes é modificada pela fabricação de microirregularidades na superfície como sulcos produzidos pela técnica de usinagem, por corrosão ácida controlada, por jatos abrasivos, pela aplicação de plasma de titânio, pelo recobrimento de tricálcio fosfato ou hidroxiapatita. Esta diversificada topografia de superfície pode afetar a resposta, *in vitro*, de células na interface dos implantes.

Rich e Harris (1981) revelaram que os macrófagos exibiram rugofilia, isto é, afinidade por superfícies rugosas. Culturas de fibroblastos adquirem orientação paralela às ranhuras da

superfície do implante, isto é, orientação por contato. Sulcos microusinados na parte cervical dos implantes têm produzido inibição da migração apical do epitélio.

Quanto a rugosidade de superfície provavelmente existem níveis ótimos para variadas aplicações funcionais, no entanto, ainda não foi possível prever qual a faixa ideal para que isto ocorra (BRUNETTE et al. 1988), pois existe problemas metodológicos para identificá-la.

Verifica-se na literatura indícios da influência da rugosidade e topografia da superfície na resposta celular. Superfícies rugosas mostraram grande diferenciação e, se ligaram melhor ao osso do que as superfícies lisas. (ALBREKTSSON e JACOBSSON, 1987).

Thoma e Cook (1985), implantes de Ti c.p. polidos ancoravam em tecido fibroso, ao passo que implantes com superfície rugosa ancoravam em osso.

A compreensão adequada dos implantes odontológicos constitui um problema complexo porque eles interagem com 3 tecidos distintos: epitelial, conjuntivo e ósseo (BRUNETTE, 1988). Um aspecto desejável da superfície do implante seria a capacidade de impedir o crescimento epitelial, o que foi possível transcutaneamente em coelhos através de sulcos horizontais microusinados sobre a superfície do implante. Na região cervical dos implantes de titânio onde a superfície tem acabamento liso, as fibras gengivais apresentam uma orientação paralela à superfície do implante, enquanto na superfície porosa coberta com plasma de Ti (rugosa), as fibras tendem a assumir uma orientação perpendicular.

Inoue et al. (1999), *in vitro*, confirmaram estes achados através de cultura de fibroblastos; porém o mecanismo que afeta a orientação de células e fibras em relação as diferentes superfícies, não é conhecido.

Na verdade pouco se sabe do efeito de vários parâmetros dos sulcos tais como, profundidade, espaçamento e orientação sobre o crescimento e inserção de células epiteliais, fibroblastos e células ósseas (CHEHROUDI; GOULD; BRUNETTE, 1990).

Pesquisas clínicas e experimentais tem mostrado que uma grande variedade de superfícies com diferentes geometrias e materiais são compatíveis com o crescimento ósseo (CLEMOW et al., 1981).

Tamanhos de poros de 45µm a 450µm e 150µm a 300µm desenvolvem resistência maior ao cisalhamento e crescimento ósseo mais rápido do que poros mais largos ou menores.

Poros nas dimensões citadas, são ótimos para a fixação biológica e estabilização do implante poroso pelo crescimento ósseo na superfície do mesmo. Cabe lembrar a importância da manufatura, pois mensurações da rugosidade da superfície de implantes parafusados experimentais e comerciais confirmam que o topo da rosca é mais rugoso que as alas e estas mais rugosas que os vales das roscas. A rugosidade de todas estas regiões deve ser considerada quando superfície de implantes bucais são avaliados, uma vez que, o osso se forma ao redor de todas as partes do implante. Macroscopicamente existem implantes odontológicos em forma de parafuso, cilíndrico, cônico e lâmina. Microscopicamente alguns implantes tem superfície lisa, usinada, texturizada ou porosa. Portanto a maior diferença entre os implantes comerciais é a topografia de superfície, pois o organismo requer funções diferentes nas diferentes áreas de superfície do implante. A porção que emerge através do epitélio gengival, geralmente é lisa na tentativa de produzir um selamento epitelial que faça frente a invasão bacteriana, enquanto o corpo do implante pode ser poroso para favorecer o crescimento ósseo e estabilização do implante (BRUNETTE, 1988).

Atualmente existe grande interesse nas propriedades de superfície dos biomateriais, pois muito pouco se conhece sobre qual estrutura e química da superfície, que agindo sozinhas ou sinergicamente, influenciam a resposta biológica e como estas propriedades são interpretadas no organismo. É clara a necessidade contínua de se pesquisar as correlações entre propriedades da superfície e resposta biológica nos diferentes níveis de resolução e sofisticação (LARSSON et al., 1996).

A microestrutura da superfície do implante pode variar consideravelmente dependendo do tratamento de superfície realizado que por sua vez, tem influenciado a retenção óssea, distribuição do estresse e a resposta celular à superfície do implante. Acredita-se que o progresso, focado no somatório de conhecimentos sobre macroestrutura, microestrutura e ultraestrutura de superfície podem proporcionar aos implantes melhor resposta tecidual e performance clínica futura melhorada. Quando existe boa quantidade óssea e ancoragem bicortical o sucesso na utilização dos implantes é mais garantido, porém em muitos casos, principalmente, na região posterior da maxila onde há um pobre trabeculado esponjoso e fina lâmina cortical óssea torna-se necessário melhorar as características do implante visando a obtenção de melhores resultados clínicos. Outra alternativa seria melhorar a qualidade óssea da área de implantação por introdução de substâncias indutoras da formação óssea (ELLINGSEN, 1998).

Evidências na literatura tem mostrado que biomateriais com diferentes composição química, aspereza de superfície e topografia provocam diferentes respostas biológicas por influenciarem o comportamento dos tecidos e das células, ou seja, forma e função celular, (LINDER et al., 1983).

A topografia (textura) da superfície dos implantes é capaz de modificar e afetar o comportamento celular, sua forma e função. Como o número, crescimento, secreção de proteínases e expressão fenotípica são influenciadas pelo formato celular, a microestrutura da superfície possui o poder de selecionar certas populações celulares em detrimento de outras, modificando a resposta biológica (KASEMO, 1983).

A textura e a integridade superficial como nos casos de recobrimento com hidroxiapatita, tricálcio fosfato, depósitos de plasma e outros desempenham papel importante na osteointegração dos implantes odontológicos. Babbush (1986) descreveu um sistema de implantes (um estágio) idealizado pelo instituto Straumann, com cobertura de plasma de titânio. Afirou que este tipo de cobertura maximizou em seis vezes a área de superfície do implante, porém o grau de controle exercido sobre a textura e possível contaminação da superfície durante o processo de usinagem é importante na reprodução de implantes que tenham efeitos biológicos positivos que favoreçam a osseointegração. O processo de usinagem dos implantes metálicos é o que melhor apresenta resultado no aspecto de contaminação. Testes apontam para taxas menores de contaminação superficial em implantes com superfície lisa do que os implantes com superfície texturizada obtidas por processos abrasivos. Caso a neutralização dos agentes ácidos (utilizados nos processos de texturização superficial química) for insuficiente ou a eliminação de elementos abrasivos (aplicados nas técnicas de abrasão mecânica) não seja realizada de maneira eficiente a contaminação poderá estar presente após o término do tratamento superficial (TEIXEIRA, 2001).

Orsini et al. (2000) em seu trabalho utilizou implantes de Ti c.p. jateados com areia onde partículas de alumina não foram eliminadas após limpeza ultrasônica, entretanto estudos ao MEV e ESCA revelaram que a descontaminação dos implantes aparentemente poderia ser conseguida com tratamento químico (condicionamento ácido).

O termo superfície usinada é geralmente usada como um produto de torneamento e, algumas vezes, é também chamada de superfície polida. Comparações entre superfícies usinadas-polidas e superfícies mais rugosas pode ser relevante para implantes bucais a serem

disponibilizados comercialmente. A superfície ideal ainda não foi definida na literatura em estudos clínicos de implantes. Apenas um único estudo controlado comparando os resultados de três anos entre implantes jateados com TiO_2 e implantes torneados não encontraram diferenças com respeito as taxas de sucesso ou nível de altura óssea ao redor dos dois tipos de implantes (WENNERBERG e ALBREKTSSON, 2000).

Revisão de literatura relacionando a resposta biológica frente a microestrutura de implantes odontológicos permitirão comparar os experimentos, observar e aplicar aspectos quantitativos já existentes aos serem obtidos futuramente seguindo a um protocolo pré-estabelecido. O torneamento no processo de usinagem podem deixar marcas ou irregularidades criando espaços que facilmente são utilizados pelas células do organismo receptor que irão desempenhar suas funções metabólicas e de remodelamento ósseo (DE SANTIS et al., 1996; JOHANSSON; SENNERBY; ALBREKTSSON, 1991).

A usinagem dos implantes a serem testados biologicamente através de cultura de células, teve por objetivo produzi-los com geometria e textura de superfície adequados tanto para a função mecânica quanto biológica, buscando assim, potencializar os efeitos de osteointegração. Dentre os implantes fabricados para comercialização, não existe nenhum com rugosidade produzida por usinagem.

Apesar dos instrumentos atuais de análise de superfície ter o potencial de estimar o desempenho biológico dos materiais e serem utilizados em pré-análises para o desenvolvimento de novos biomateriais de implante, antes de qualquer aplicação clínica em pacientes são importantes avaliações biológicas da resposta celular e tecidual associadas a metrologia da rugosidade de superfície.

Muitas publicações tem revisto os métodos de caracterização da superfície, pois definir a natureza da superfície biomaterial é condição essencial para entender as interações com o sistema biológico. A rugosidade da superfície tem mostrado influenciar as reações biológicas nos tecidos mole e ósseo. Um perfilômetro é comumente usado na indústria metalúrgica e microeletrônica para avaliar quantitativamente a rugosidade e ocasionalmente é usado em pesquisas de biomateriais. Novos métodos têm sido investigados para medir superfície rugosa com promessa de desenvolvimento futuros para aplicação rotineira na avaliação de biomateriais. O estudo da relação biológica-rugosidade de superfície dos biomateriais é valioso para qualquer biointeração ou estudo clínico de biomaterial.

Controvérsias existem sobre quais propriedades de superfície são mais relevantes para a biointeração. Ainda não estão claros os parâmetros biológicos e físicoquímicos apropriados para medida desta interação (biocompatibilidade-compatibilidade sanguínea ao material). Pesquisas em busca de definição e medição dos parâmetros biológicos aumentarão a importância e significado da análise de superfície, (RATNER; JOHNSTON; LENK, 1987) o que, vice-versa é verdadeiro.

Superfícies rugosas ou texturizadas e porosas são confeccionadas em muitos projetos de implantes utilizados em odontologia. Espera-se que o aumento da área de superfície de tais topografias promovam maior potencial para inserção celular e crescimento tecidual no implante e conseqüentemente melhor estabilização mecânica do implante (BRUNETTE, 1988).

As descrições da topografia da superfície encontrada na literatura tem muitas afirmações confusas. A medida da rugosidade dos materiais em forma de parafuso representa a maior dificuldade para análise (WENNERBERG e ALBREKTSSON, 2000).

A quantificação da rugosidade de superfície é relevante pois as células e tecidos respondem à textura superficial do implante. Von Recun e Von Kooten (1995), observaram que a rugosidade superficial, com rugosidade média (R_a) em torno de $1,0\mu\text{m}$ a $1,5\mu\text{m}$ proporcionam melhor resposta óssea. Acima destes valores, nenhuma resposta positiva do osso pode ser esperada. A rugosidade dentro destes limites faz com que os osteoblastos identifiquem estas rugosidades e estimulam o tecido ósseo que responde com maior crescimento ósseo em experimentos de células ósseas *in vitro* (com resposta óssea mais rápida, deposição e mineralização da matriz aumentadas).

Grande variação de valores de rugosidade em superfícies usinadas são mostrados na literatura como $0,08\mu\text{m}$ -Cooper et al., (1999); $0,15\mu\text{m}$ – Buser et al., (1999); $0,35\mu\text{m}$ – Vercaigne et al. (1998a); $0,7\mu\text{m}$ – Suzuki, Aoki, Ohya, (1997); $1,3\mu\text{m}$ – Kipaldi e Lemons (1994) e $4,7\mu\text{m}$ - Vercaigne et al. (1998b). Para superfícies com plasma *spray* de Ti, um amplo limite de valores de rugosidade tem sido relatado desde $0,5\mu\text{m}$ – Cooper et al. (1999), a um valor intermediário de $2,4\mu\text{m}$ – Vergaigne et al. (1998a), $3,1\mu\text{m}$. – Buser et al. (1999) ou $4,0\mu\text{m}$ Suzuki; Aoki; Ohya (1997) e para valores extremamente alto como $18,9\mu\text{m}$ – David et al. (1995) ou $37,9\mu\text{m}$ – Vercaigne et al. (1998b). Valores tão diferentes são produtos do uso de equipamentos e comprimentos de medidas diferentes utilizados, como também, resultado

de avaliações bi e tridimensionais adicionados por diferentes tamanhos de filtros utilizados (WENNERBERG e ALBREKTSSON, 2000).

Michaels et al. (1989) observam que maior porcentagem de células semelhantes a osteoblastos se inseriram em superfícies rugosas de titânio c.p., produzidas por jato de areia, do que em superfícies lisas e polidas com pasta de diamante.

Resultado melhor de osteointegração, cabe lembrar, não está diretamente relacionado com aumento de rugosidade de superfície, pois implante jateado rugoso condicionado tem menor altura pico-vale comparado ao implante com plasma *spray* de Ti. No entanto, o implante jateado rugoso condicionado apresenta melhor desempenho nos testes mecânicos como na avaliação histológica. Em função disto, análise detalhada da superfície tem sido realizada na tentativa de identificar os parâmetros mais apropriados para o uso em projetos da superfície de implantes dentais (WONG et al., 1995).

Implantes endósseos com rugosidade ideal da superfície provavelmente dependem da distribuição do osso cortical e esponjoso e da carga imposta ao implante (WENNERBERG et al., 1995).

Investigando o efeito da rugosidade de superfície de implantes de titânio em coelhos, Wennerberg et al. (1996) criaram quatro superfícies diferentes através de jatos com Al_2O_3 e TiO_2 sobre a superfície usinada. As superfícies foram jateadas com partículas de TiO_2 de $25\mu m$ e partículas de Al_2O_3 de 25, 75 e $250\mu m$. Os autores através de exames histomorfométricos mediram o contato osso-implante e concluíram que os implantes com rugosidade média (R_a) de $1\mu m$ a $1,5\mu m$ obtiveram ótima retenção óssea. Implantes jateados com partículas de $25\mu m$ resultaram numa rugosidade média igual a $0,83\mu m$, os com partículas de $75\mu m$, um R_a igual a $1,29\mu m$ e os com partículas de $250\mu m$ um R_a igual a $2,11\mu m$. Esta última superfície mais rugosa criada por partículas maiores não melhorou em nada a resposta biológica óssea. Considerando as três melhores roscas dos implantes tratados com partículas de $25\mu m$ estes apresentaram maior contato osso-implante que os implantes tratados com partículas de $250\mu m$, porém foram quase idênticos os valores no teste mecânico de torque de remoção.

Vários trabalhos na literatura como os de Bowers et al. (1992), *in vitro* e Hayashi et al. (1994), Wong et al. (1995), Chehroudi; McDonnell; Brunette (1997), Wennerberg et al.

(1998), Piattelli et al. (1998) em estudos em animais tem demonstrado que a resposta óssea é mais rápida frente à superfícies rugosas que nas superfícies polida, lisa ou torneada.

O desenvolvimento e a utilização de implantes para recuperar perdas dentárias tem passado por várias fases na busca de uma ancoragem permanente das próteses bucais. Diferentes materiais, formas e técnicas de tratamento com implantes foram desenvolvidos, entretanto é necessário se conhecer mais profundamente a interação entre material de implante e os tecidos biológicos. Afim de se prever a resposta tecidual, necessário se torna conhecer qual o material e o tipo de superfície proporcionam melhores respostas teciduais e celulares, ósseas, epiteliais e conjuntivas. O implante uma vez instalado no tecido ósseo, uma série de reações acontece sobre sua superfície. Ele é exposto a uma série de íons diferentes, polissacarídeos, carboidratos, proteínas e células como condroblastos, fibroblastos e osteoblastos que reagem com sua superfície. Às reações iniciais entre constituintes teciduais e a superfície do implante governa reações adicionais e determina a atividade biológica da superfície e resposta celular à superfície. Esta resposta celular depende da natureza da superfície e de suas propriedades químicas que influenciam diretamente a composição subsequente do filme protéico que adsorve sobre a superfície do implante. A maioria das superfícies de implante apresenta reação não específica onde vários processos simultâneos ocorrem e resultam numa competição complexa entre reações com resultado imprevisível. Ao se projetar um implante deve-se ter controle da estrutura da superfície pois dela dependem a adsorção e adesão de proteínas, crescimento e ativação celular. Reações, estas, que deveriam ser rápidas e específicas estimulando o crescimento ósseo ao redor dos implantes. Estas melhoras possibilitariam a colocação de implantes em áreas de má qualidade óssea, principalmente região posterior de maxila (ELLINGSEN, 1998).

Wennerberg e Albrektsson (2000) esclarecem que comparações entre superfícies usinadas e superfícies rugosas tem sido realizadas sem mencionar que a superfície usada pode apresentar um amplo limite de textura de superfície. Implantes intermediários com desvio de altura de $1\mu\text{m}$ a $1,5\mu\text{m}$ tem se revelado em estudos experimentais uma ótima rugosidade de superfície para a resposta biológica do tecido ósseo.

A descrição de um implante e sua superfície pode ser realizada levando-se em consideração sua forma, ondulação e rugosidade. A forma do implante em resolução milimétrica pode influenciar a resposta óssea. Exemplo disto, é visto pelo pobre nível ósseo ao redor de implantes cilíndrico quando comparados com os implantes em forma de parafuso

a longo prazo. Sobre as ondulações do implante os pesquisadores acreditavam que osso não poderia invadir poros menores que $100\mu\text{m}$, o que é verdadeiro, quando no meio ósseo existe canais haversiano típicos circundado por osteócitos arranjados circunferencialmente. Entretanto, sem um sistema haversiano completo, o tecido ósseo pode invadir poros menores que $1\mu\text{m}$ de resolução, que estão sendo indicados para rugosidade do implante. Provavelmente a rugosidade do implante bucal está a nível de nanômetros de resolução, porém, atualmente, existe pouca evidência na literatura dando suporte a esta teoria. Ao serem fabricadas superfície rugosas a nível de micrômetros podemos esperar também uma mudança simultânea na superfície a nível de nanômetros que de acordo com a teoria é um fator decisivo na resposta biológica. Nos estudos sugere-se que implantes bucais são melhor avaliados na resolução de micrômetros e que ondulação e rugosidade deveriam ser relatados como entidades separadas. Provavelmente a resposta biológica depende do efeito combinado da ondulação e rugosidade de superfície (WENNERBERG e ALBREKTSSON, 2000).

As superfícies usadas nos implantes fabricados tem sido realizadas dentro da tecnologia dos materiais disponíveis, sendo muitas vezes, os princípios do comportamento celular ignorados (BRUNETTE, 1988).

Rich e Harris (1981) avaliaram *in vitro* a resposta celular (inserção celular) em meios de cultura frente a superfícies rugosas e lisas. Os fibroblastos preferiram as superfícies lisas enquanto os macrófagos às superfícies rugosas, tendo os autores denominado este comportamento celular de “rugofilia”. Brunette (1988) esclarece que, esta tendência de superfícies rugosas atraírem células da linhagem dos monócitos é preocupante, pois sabemos que os osteoclastos são derivados destas células. Superfícies preparadas e propícias para a inserção celular podem afetar diretamente a forma e função celular. As células crescem com maior intensidade ao redor de substratos rugosos apresentando uma forma celular mais circulares. Em substratos planos ou lisos crescem com menor intensidade e apresentam uma forma celular mais alongada. Propriedades celulares tais como o número de células, crescimento celular, secreção de proteinases e expressão fenotípica (genética) são afetados pela forma da célula. Portanto, a topografia (textura) da superfície de um implante tem o potencial de selecionar certas populações de celulares e alterar sua forma e função.

Como já foi dito antes, a rugosidade pode ser considerada sob os níveis de macroestrutura, microestrutura e ultraestrutura, que provavelmente tem, efeitos diferentes sobre os tecidos vivos. Baseado em vários estudos, tem sido estabelecido na literatura a

necessidade de 100 μ m de tamanho mínimo de poros para se vislumbrar um crescimento ósseo completo dentro das irregularidades do implante. Crescimento ósseo dentro de cavidades ou poros deste tamanho propiciarão um entrelaçamento mecânico do osso com o material de implante.

Clemov et al. (1981) estudaram o crescimento ósseo frente a implantes femurais de Ti-6Al-4V com tamanho de poro limitado de 175 μ m a 235 μ m. Esclareceram que o tamanho de poro ótimo para se obter crescimento ósseo pode estar na dependência do material utilizado. Hansson; Albrektsson; Branemark (1983) informam que análise microscópicas ópticas revelam contato direto e íntimo entre o implante de titânio e o tecido ósseo adjacente. O osso estava bem organizado, de maneira regular, com sistemas de Havers e lamelas ósseas incrementais ao longo da interface. Este fato sugere, tratar-se de osso vital com remodelamento ativo e de acordo com as forças oclusais aplicadas. Vasos sanguíneos foram ocasionalmente encontrados em forte conexão com a superfície do implante. Na interface osso-implante foi evidente a ausência de formação de cápsula fibrosa, bem como fibroblastos, macrófagos e células inflamatórias.

Ellingsen (1998) afirmou que os poros de 100 μ m para a liga de titânio tinha um ótimo tamanho. Valores maiores de torque à remoção foram encontrados quando foi usado parafuso de aço inoxidável com rugosidade de 10 μ m-40 μ m cobertos com titânio, pois apesar de não permitirem um crescimento ósseo máximo, puderam proporcionar retenção aumentada baseado no entrelaçamento mecânico. Este entrelaçamento tem sido observado em estudos de crescimento ósseo aos implantes de titânio e alumínio com canais de diâmetro de 95 μ m-100 μ m. Constatou-se crescimento ósseo mais rápido dentro de canais com diâmetro de 500 μ m-1000 μ m e nenhum crescimento em canais de 95 μ m.

Embora a superfície rugosa em escala micrométrica melhore a retenção, *in vitro*, estudos de células indicam que esta propriedade da superfície influencia a função celular, a deposição da matriz e a mineralização (MARTIN et al., 1995; SCHWARTZ et al., 1996; BIBYAN et al., 1999).

Thoma e Cook (1985) revelaram que implantes com superfície lisa exibiram menor resistência ao torque que os correspondentes com superfície rugosa.

Brunette, 1988; Chehroudi; Gould; Brunette, 1989; Chehroudi; Gould; Brunette, 1990 citam que as células parecem ser sensíveis e capazes de usar a microtopografia da superfície (morfologia do material) para sua orientação e migração.

Carter (1965) utiliza o termo “haptotaxia” para descrever a direção do movimento celular que ocorre como resultado do gradiente de adesão sobre o substrato. Traduzindo, materiais com alta energia de superfície são mais adesivos, espera-se que as células se acumulem e se adiram mais ao implante, sendo o contrário verdadeiro e podem resultar em formação de cápsula fibrosa.

Baier et al. (1982) investigaram a influência da energia de superfície na incorporação de vários materiais biomédicos. Observaram que a energia de superfície e o estado de limpeza do implante exercem grande influência na cicatrização e formação das células dos tecidos adjacentes. Uma baixa energia de superfície e métodos de limpeza precários podem comprometer as fases iniciais da cicatrização tecidual após a inserção dos implantes. Nos materiais com alta energia de superfície ocorreu aumento de inserção de fibroblastos. Os autores concluíram que o povoamento celular inicial e adesão celular podem ser influenciados pela presença de cobertura condicionantes provenientes dos tecidos do hospedeiro, cujas propriedades são dependentes da energia da superfície dos implantes. A energia de superfície de um implante é dependente da manipulação durante a usinagem, do tipo de armazenagem e do manuseio no ato cirúrgico. A presença de contaminantes podem modificar as propriedades químicas e a energia de superfície, prejudicando a resposta biológica ao implante. Demonstraram os efeitos nocivos do método de esterilização. O método de esterilização convencional produziu uma camada superficial de contaminantes do metal. A esterilização por descarga incandescente de radiofrequência resultou em energia extremamente alta na superfície do implante com um mínimo de contaminantes. Investigaram ainda, a formação de uma película biológica e sua influência na bioadesão sobre interação inicial. Concluíram, que a qualidade de superfície do material do implante é essencialmente crítica na determinação precoce dos biofilmes.

Linder et al. (1983) a interação tecido-superfície é mais dinâmica do que estável e passará por estágios. Nos primeiros segundos após a implantação, essencialmente deverá existir água, ions dissolvidos e biomoléculas livres em estrita proximidade com a superfície. A composição do biolíquido mudará continuamente com a inflamação e o processo cicatricial. Eventualmente, células se aproximarão da superfície e, dependendo da natureza da camada de

adsorção, elas responderão especificamente, ou seja, dependendo do tipo de interação inicial o resultado final pode ser formação de cápsula fibrosa ou integração óssea. Alta energia de superfície permitem maior expansão de água, sangue e fluidos corporais sobre a superfície do implante, sendo um parâmetro relevante, principalmente no processo cicatricial inicial, tendo Uniyal; Brash (1982), Breenhaar et al. (1984) e Campos Jr. e Passaneli (1996) denominado esta capacidade de “molhabilidade”. A medida de “molhabilidade” é fornecida pela análise do ângulo de contato interno da gota de um líquido conhecido com a superfície de um substrato. Quanto menor este ângulo, melhor o líquido se distribui sobre a superfície do substrato. Este método de classificação de energia de superfície é um indicador de adesão celular.

A rugosidade da superfície afeta a maturação de células (BRUNETTE, 1988). Por sua vez, dependendo do estágio de maturação das células os condrócitos são afetados diretamente por fatores locais como vitamina D e fator de crescimento transformador beta (β) (SCHWARTZ et al., 1993; SCHWARTZ et al., 1996; BOBYAN et al., 1999).

Portanto, a microtopografia associada a energia de superfície pode influenciar a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em fibroblastos, condrócitos ou osteoblastos. Postula-se ainda que a osteogênese pode ser favorecida pelo adequado crescimento vascular enquanto um crescimento vascular limitado pode induzir a condrogênese.

Kasemo e Lausmaa (1988) detalharam, a nível atômico, a interface metal-tecido, ela é composta pelo óxido de titânio (2 a 5nm de espessura) e pelo fluido biológico (biolíquido) constituído de macromoléculas de H_2O , ions dissolvidos e biomoléculas representadas por uma proteína com sua cápsula adjacente de água. A natureza da interação entre átomos da superfície mais externa do implante e as proteínas e/ou biomoléculas é importantíssima para a resposta do sistema biológico ao implante. Irregularidades de superfície de diferentes dimensões influenciam a interação metal-tecido, quando as mesmas se igualam às unidades biológicas em tamanho.

Implantes com microrugosidades tem sido testados em animais e humanos. Buser et al. (1991) investigaram a resposta óssea medindo o contato osso-implante frente a diferentes tratamentos de superfície em implantes de titânio. As superfícies tratadas foram plasma *spray* de titânio, jato de areia e condicionamento ácido e cobertura de hidroxiapatita. Histologicamente, os autores encontram forte relação entre o aumento da rugosidade e o

contato ósseo. Ao torque os valores de remoção foram maiores para os implantes jateados quando comparados aos usinados. Superfícies de titânio podem ser jateadas com partículas de TiO_2 proporcionando microrugosidades.

Estudos recentes *in vitro* e *in vivo* fornecem claras indicações que a resposta biológica ao titânio são influenciadas pela estrutura da superfície e composição química. Em nosso trabalho a composição química do material não preocupa pois trata-se de Ti c.p. com alto grau de pureza com a seguinte especificação – ASTM F67 G2. Material fornecido pela Ti Brasil Titânio Ltda, sediada no município de Jandira – SP – Brasil e membro da ITA (Titanium International Association). Entretanto os tipos de preparação de superfície e métodos de caracterização utilizados mundialmente, não permite conclusão e não estabelece quais as propriedades de superfície representam o fator determinante para diferenças observadas na resposta biológica.

A maioria dos estudos sobre o papel das propriedades da superfície da resposta óssea ao titânio tem sido relacionada com a topografia (textura) da superfície. O papel da rugosidade da superfície de titânio na inserção de osteoblastos *in vitro* e resposta óssea *in vivo* tem sido estudada por vários autores. *In vitro*, osteoblastos se inserem e se espalham mais prontamente sobre superfícies de Ti rugosas do que sobre superfícies lisas. *In vivo*, mostram clara tendência para aumento na formação óssea ao redor de superfícies de implantes com rugosidade aumentada.

Buser et al. (1991) investigaram a resposta óssea a implantes eletropolidos, jateados com areia e plasma “spray” de titânio. Os autores não encontraram diferença significativa no contato implante-tecido ósseo entre as superfícies jateadas (com rugosidade média de $6\mu m$) e a lisa polida. Porém, os resultados deste trabalho ofereceram uma forte indicação da importância da topografia de superfície em escala micrométrica, pois rugosidade de superfície numa escala superior ou igual a $1\mu m$ pode influenciar a formação óssea dos implantes de Ti.

Thoma e Cook (1985), examinando o contato osso-implante concluíram ser a textura da superfície um parâmetro significativo na fixação do implante. Thoma e Cook (1985); Carlsson et al. (1988); Buser et al. (1991) através de estudos *in vivo*, constataram melhor fixação óssea nas superfícies rugosas do que nas lisas.

Segundo Rich e Harris (1981); Murray, Rae, Rushton (1989) a superfície rugosa tem promovido melhor cicatrização óssea com conseqüente atração de macrófagos, reforçando o

conceito de que as células são sensitivas à microtopografia. Este parece ser o caso das células osteoblásticas que demonstram maior inserção inicial à superfície de titânio rugosa (MICHAELS et al., 1989; BOWERS et al., 1992).

Porém, pouco se conhece do efeito da rugosidade da superfície sobre o metabolismo e diferenciação dos osteoblastos. Foi constatado que a superfície rugosa de titânio acentuou a atividade da fosfatase alcalina, mineralização dos osteoblastos embriogênicos e aumentou a síntese de RNA em cultura de células. *In vivo*, induziu à formação de tecido ósseo, enquanto a superfície lisa propiciou a formação de tecido fibroso representado por uma cápsula fibrosa. A vantagem da superfície rugosa para osseointegração pode ser explicada pelo fato de proporcionar melhor produção de matriz e taxas mais altas na síntese de colágeno. A incorporação de sulfato (um marcador para a síntese de proteoglicana) diminuiu sobre a superfície do titânio em comparação ao plástico do meio de cultura. Na camada celular de células MG63 foi detectado amplo posicionamento da fosfatase alcalina nas vesículas da matriz (organelas que participam na calcificação). Esta ocorrência indica que a atividade específica na fosfatase alcalina aumentou com a rugosidade de superfície e possivelmente a calcificação óssea. O efeito da rugosidade de superfície sobre as células do tecido hospedeiro pode ser resultado da própria superfície rugosa ou da reação que ocorre quando a superfície do material é condicionada ao soro sanguíneo e ao próprio meio fisiológico. Na interação inicial, o comportamento celular se modifica produzindo uma camada de macromoléculas. Fibronectina (uma proteína de adesão celular presente no soro) espalha-se sobre o substrato artificial (implante), interage com glicosaminoglicanas e esqueleto celular mediando assim a inserção celular. O autor acredita ser possível que a superfície rugosa possa ter absorvido maior quantidade de fibronectina que outras superfícies, preservando a síntese de proteínas extracelular (MARTIN et al., 1995).

Thoma e Cook (1985) investigaram o crescimento ósseo (aposição) frente a materiais de implante como polietilmetacrilato, carbono, óxido de alumínio e titânio. Histologicamente os implantes lisos exibiram tecido fibroso com encapsulamento em vários graus, enquanto os implantes rugosos (jatos de partículas) mostraram a aposição óssea direta.

Albrektsson et al. (1981) observaram a resposta dos tecidos conjuntivo-epiteliais e ósseo frente a um sistema de implante de titânio. Os três tecidos se aderiram fortemente aos implantes, sendo que o epitélio se apresentou com tamanho, forma e densidade populacional celular normal.

A resposta do biomaterial reativo é governada pelo seu grau de solubilidade que, uma vez no interior dos tecidos podem promover reações iônicas com liberação de partículas, como é o caso de materiais cerâmicos, vidro e fosfato de cálcio cerâmico. A solubilidade influencia também a remoção de fluido intercelular, atividade macrofágica celular, bactéria, PH, desgaste e corrosão devido à situação biomecânica, processo eletroquímico na interface e outros fatores. Estes processos geralmente implicam numa mudança da composição química e propriedades físicas da interface (GROSS, 1988).

Bowers et al. (1992), *in vitro*, analisaram as respostas celulares de células da calvária de ratos sobre diferentes rugosidades de superfície do Ti c.p. Constataram que o tipo de rugosidade da superfície modifica a resposta biológica inicial e a aderência celular. Observaram maior quantidade de células inseridas nas superfícies rugosas jateadas do que as superfícies rugosas confeccionadas por papel metalográfico ou condicionamento ácido. Concluíram os autores que, implantes jateados proporcionam um ambiente único e promovem uma boa inserção celular inicial, tendo a análise morfométrica mostrado maior contato osso-implante nas superfícies mais rugosas.

Keller et al. (1994), utilizou três caracterizações diferentes no Ti c.p. e liga de Ti-6Al-4V com teste biológicos, *in vitro*, para observar a resposta de células osteoblásticas. Apesar da liga de titânio apresentar camada de óxido mais espessa e alumínio na sua composição, biologicamente a resposta celular inicial pareceu não ser influenciada quanto à aderência e morfologia, sendo semelhantes os níveis de inserção celular e adaptação das células às superfícies.

Martin et al. (1995), avaliaram, *in vitro*, o papel da rugosidade superficial na proliferação e diferenciação osteoblástica e na síntese de proteínas frente a cinco diferentes tratamentos de superfície no titânio. Os autores sugeriram que a rugosidade superficial dos implantes pode desempenhar algum papel na determinação da expressão fenotípica das células *in vivo*. Grande impacto sobre a ancoragem de implantes dentais no tecido ósseo pode ser conseguido se houver um melhor entendimento do relacionamento entre o arranjo citoesquelético das células e a microestrutura da superfície. O conceito de que as células são sensíveis a microtopografia se baseia no fato de que algumas células podem se orientar em sulcos de superfície usinada.

Cochran et al. (1991) acreditam que superfícies jateadas e condicionadas podem possuir propriedades osteocondutivas, pois encontraram menor perda óssea coronal em implantes nesta condição.

Não foi observado qualquer efeito do íons alumínio sobre superfícies de implantes jateados e condicionados. Pois toda partícula de alumina residual foi eliminada pelo processo de condicionamento ácido nos estudos realizados por Wennerberg et al. (1996); Wennerberg, Albrektsson, Lausmaa (1996); Wennerberg, Albrektsson, Andersson (1996).

Orsini et al. (2000), utilizaram fibroblastos L929 de ratos prague Dawley para testar a citotoxicidade da superfície do titânio com rugosidade média de $0,75\mu\text{m}$ para o grupo controle e $2,15\mu\text{m}$ para implante teste. O resultado no líquido de extração do implante teste revelou resposta celular não citotóxica em quatro concentrações avaliadas de fibroblastos durante um período de 24h. Avaliações em Microscopia de Luz, MEV e Teste de MTT revelaram biocompatibilidade dos implante teste e controle. No controle positivo foi detectada uma diminuição drástica na atividade enzimática SDH (0,101) enquanto nos espécimes teste os valores resultantes estavam mais próximos daqueles vistos para controle negativo (0,344x0,340). A enzima SDH é extremamente sensível à presença de efeitos tóxicos. Os implantes tratados por jateamento e condicionamento produziram superfícies quase livres de alumina. Esta transitória e limitada liberação de íons alumina provavelmente não interferiu no mecanismo de aderência dos fibroblastos nas superfícies jateadas-condicionadas. Propriedades geométricas da superfície parecem afetar os componentes da célula, do citoesqueleto que estão envolvidos na dispersão e locomoção celular. Superfícies mais rugosas pode também aumentar a atração de células osteoblásticas, influenciando a configuração e conformação de pseudópodes celulares que são importantes para adesão celular, assim como, induzem as células a liberarem níveis mais altos de fatores envolvidos na regulação da formação óssea.

Para Baier e Meyer (1988) a qualidade da superfície do implante é caracterizada por textura ou rugosidade, carga ou potencial elétrico e energia ou tensões da superfície. Quanto á textura de superfície, deveria existir um consenso geral sobre que níveis mecânicos, área de superfície e aumento geométrico relacionados com o aspecto estrutural, podem melhorar a adesão aos implantes geralmente por entrelaçamento mecânico. A identificação de critérios quantitativos sobre a rugosidade de superfície desejável ainda não estão bem esclarecidos. Poros interconectados de $150\text{-}250\mu\text{m}$ em estruturas porosas propiciam o crescimento celular e

a heterogeneidade em largura ou profundidade na escala de 1 μm ou menos são praticamente insignificantes nas interações tecido biológico-material, pois a deposição espontânea de macromoléculas pelo organismo acabam por nivelar e transformar as propriedades da textura da superfície destes materiais de implante a uma condição bastante similar. Propriedades elétricas da superfície, tais como carga da superfície e potencial zeta tem sido pesquisado como controle para acumulação e aderência da matéria sobre vários materiais de implante. Quando materiais controlados eletricamente (positivo, negativo ou neutro) são expostos a salina ou restos alimentares contendo proteína, todas as qualidades da superfície elétrica tornam-se idênticas quando medidos pelo potencial da corrente e métodos potencial Zeta. Portanto, os eventos da adesão celular em situações iônico-fisiológicas estão além da influência prática das propriedades elétricas do implante. Controle da energia da superfície, pode ser necessária, porém, as fases biológicas podem umedecer espécime (implante) para eliminar ar preso na ranhura ou outras irregularidades. O estado químico inicial da superfície pode facilitar o desempenho da inserção celular, remodelamento e outros eventos bioadesivos. Materiais inorgânicos utilizados para implantes dentais são caracterizados por uma tensão superficial crítica de 40 Dynes/cm. Materiais com baixa energia de superfície, de aspecto hidrofóbico para metais e materiais cerâmicos manipulados descuidadamente alterando a liberação de biofilmes subjacentes, acabam por induzir resposta de corpo estranho com a conseqüente formação de uma cápsula conjuntiva fibrosa recobrando o implante. Metais limpos moderadamente, ligas metálicas, cerâmicas e alguns polímeros com alta energia de superfície induzem eventos mais agressivos à célula com adesão parcial à superfície do implante. São observadas também cápsulas mais finas e atividade celular aumentada próximo a interface material inorgânico-biotecido. Estas alterações implante-tecido pode resultar em bioadesividade suficiente para servir as necessidades clínicas. Para se induzir justaposição das células do tecido conjuntivo, através de biofilme glicoprotéico, futuros métodos de preparação da superfície deverão produzir e manter alta energia de superfície dos implantes. Isto propiciará abundante espalhamento celular, indução da atividade mitótica da células, crescimento e locomoção dos materiais para construção da matriz celular e filamentos colágenos. No tecido ósseo, remodelação contínua na interface e contato osso-implante favorecerão a aposição direta de osso sobre a superfície do implante. Esperam os autores, que com o aumento da rugosidade de superfícies se consiga melhores condições à osteointegração.

A capacidade de substrato usinado ranhurado em produzir orientação celular e migração direcionada foi mostrada por Chehroudi, Gould, Brunette, 1990. Sulcos horizontais

usinados em forma de “V” com 10 μ m de profundidade e 39 μ m de espaçamento inibiram a migração apical do epitélio. Os sulcos horizontais inibiram a migração epitelial enquanto sulcos verticais encorajaram o crescimento epitelial, tendo as células epiteliais e fibroblastos respondido de maneira diferente às dimensões dos sulcos.

A tendência da locomoção celular ser guiada ou direcionada pela topografia de superfície do substrato para as quais as células são inseridas é referida como guia de contato. O comportamento celular sobre os efeitos dos sulcos produzidos nos implantes já é reconhecido. O titânio é o material mais extensivamente utilizado para implantes bucais. Varias topografias de superfície tem sido desenvolvidas buscando otimizar ainda mais a integração tecidual. Superfícies de Ti sulcadas tem demonstrado afetar o comportamento e orientação celular *in vitro* e *in vivo*, pois inibem o crescimento epitelial. Ainda, segundo os autores, as topografias usadas em implantes odontológicos podem ser: sulcada, rugosa, porosa, sinterizada e condicionada. A intenção de se produzir estas formas é otimizar a adaptação tecidual ao implante. Diferentes formas de implante oferecem diferentes respostas do tecido mole e ósseo. Superfície ótima para o tecido conjuntivo não pode ser ótima para o tecido epitelial e vice-versa. Pesquisadores e fabricantes tem procurado idealizar um implante que possa incorporar a topografia de superfície específica para cada população celular (CHEHROUDI; GOULD; BRUNETTE, 1989).

Implantes dentais uma vez colocados estão em íntimo contato com dois ambientes. Ele deve se manter em meio interno representado pelo tecido ósseo maxilar associado ao conjuntivo epitelial da cavidade bucal, onde há certamente biofilme e microorganismos que podem ser deletérios à sobrevivência da estrutura do implante. A conexão entre os dois ambientes se dá através de um intermediário transmucoso que atravessa do ambiente interno ao externo; aspecto este, que faz com que o implante dental seja único (MCKINNEY et al, 1988).

Para Brunski (1988), um implante em função transfere forças (carga oclusal) ao tecido interfacial. A força de contato interfacial, cisalhamento ou compressão pode depender da ligação implante-tecido e variar ponto a ponto da superfície. O estresse interno no tecido depende da interface tecido-implante, desenho (geometria) e propriedade mecânica do implante. As propriedades mecânicas do tecido interfacial podem ser anisotrópicas, viscoelásticos, não homogêneas e tempo dependente em função da atividade biológica ser mediada mecanicamente. O autor opina, que decisões sobre o tamanho, forma, material,

textura de superfície ou cobertura do implante continuarão a ser feitos numa atmosfera de empirismo até que se tenha conhecimentos adequados sobre atividade mecânica e biológica dos implantes.

Novas técnicas de preparo de superfície pretendem conseguir modulação tecidual mais rápida, confiável e ancoragem mecânica estável dos implantes nos tecidos ósseo e conjuntivo. Na verdade procura-se desenvolver e controlar os tipos de ligação exigida na interface implante-tecido, para melhorar os aspectos bioadesivos da implantodontia dental (BAYER e MEYER, 1988).

Anteriormente as pesquisas eram conduzidas em torno das propriedades mecânicas, a nível macroscópico e biocompatibilidade do material. Através de observações clínicas e histológicas os experimentos foram progredindo lentamente, até quando, na década de 90 ocorreu o casamento da ciência do material com a biologia experimental. O estado de conhecimento da biologia associado com implantes, tornou possível examinar a interação material-biosistema com precisão a nível molecular. Deveremos assistir nos próximos 20 anos, o progresso da ciência relacionada aos fenômenos biomecânicos, que possibilitarão visualizar a arte clínica em níveis mais sofisticados da ciência implantológica. Para tanto, alguns conceitos devem ser compreendidos como: a) biologia, representa o limite de entidades biológicas com as quais os materiais podem interagir, variando componentes inorgânicos a orgânicos completos; b) composição do material, que pode variar de material puro a compósitos heterogêneos, sendo a principal variável sob nosso controle; c) estrutura, que refere-se ao estado físico da superfície, condições de superfície que podem ser atômicamente planas a literalmente porosas (YOUNG, 1988).

Observação macroscópica, microscopia eletrônica e análise quantitativa são os métodos utilizados para avaliação da estrutura-condição de superfície dos implantes dentais. Para tornar o tratamento implantológico mais rápido, confiável e previsível é necessário conseguir o controle sobre as propriedades da superfície, o grau de integração tecidual e o grau de função mecânica uniforme (BAYER e MEYER, 1988).

A fabricação de implantes deve se embasar em dados experimentais válidos, sólidos e fornecer informações científicas adequadas, necessárias e exigidas antes de serem submetidos ao uso clínico. Estas informações deveriam incluir experimentos analíticos bem documentados, seguido de experimentos animais e posteriormente humanos. Índices de

avaliação adequados e análise dos resultados deveriam ser utilizados para tornar estes experimentos confiáveis (MACKINNEY et al., 1988).

Com o crescente avanço da implantodontia e com o desenvolvimento de novos biomateriais, linhagens celulares osteoblásticas originadas de tecido ósseo normal (não patológico) serão as mais indicadas para análise *in vitro*, antes da realização dos testes *in vivo* em animais experimentais e posterior emprego clínico no homem, cumprindo as normas citadas pela ISO (International Organization de 1992) para aprovação do uso clínico destes materiais. A partir do tecido ósseo normal pode ser obtida linhagem celular através do método de dispersão enzimática e cultivo celular primário. A obtenção de linhagens celulares que apresente características osteoblásticas será de grande aplicação na odontologia, não só em estudos da fisiopatologia óssea como em testes de bio-compatibilidade de materiais que estarão em constante contato com o tecido ósseo, como no caso dos implantes dentais. As principais vantagens na utilização de culturas celulares residem no controle físico-químico do ambiente de crescimento celular, na manutenção relativamente constante das condições fisiológicas na cultura e na possibilidade de trabalho com linhagens celulares uniformes (DEBONI; JAEGER; ARAÚJO, 1996).

Evita-se ainda os problemas relacionados com questionamentos sob ponto de vista legal, moral e ético dos experimentos com animais (FRESHNEY, 1990).

A dispersão de células empregando incubação de 5min. em cinco tempos em solução de Tripsina 0,25% provou ser bastante efetiva na obtenção de células tornando possível a propagação da linhagem celular osteo 1 (osteoprogenitoras e osteoblásticas). A concentração de 0,25% da Tripsina é bem compatível com a preservação da vitalidade celular, sendo esta concentração rotineiramente utilizada para subcultivo de células já em cultura. A concentração e tempo de atuação da solução enzimática empregada neste protocolo é proposto por Deboni; Jaeger; Araújo (1996) sendo menor do que o recomendado pela literatura, com resultados semelhantes no que diz respeito ao número de células obtidas.

Entretanto, de forma geral, a identificação ou caracterização de populações de células ósseas é muito complexa, pois uma vez isoladas elas perdem sua identidade morfológica (YANG et al., 1992).

Os parâmetros utilizados para identificar (caracterizar) osteoblastos em culturas são únicos, geralmente baseado em um somatória de propriedades como morfologia celular,

características citoquímicas, bioquímicas, imunocitoquímicas (WIESTNER et al., 1981; MANIATOPOULOS et al., 1988; BELLOWS et al., 1992; YANG et al., 1992) e hormonais que as células cultivadas possam apresentar (DEBONI; JAEGER; ARAÚJO, 1996). Adicionalmente (BELLOWS et al., 1986; MANIATOPOULOS et al., 1988; YANG et al., 1992) acrescentam que deve ser observada a capacidade das células cultivadas de produzirem matriz mineralizada *in vitro*. A síntese de produtos celulares funcionais específicos e especializados está sob controle regulatório de hormônios, da interação célula-célula e da interação célula-matriz.

A proliferação contínua de células precursoras indiferenciadas necessita de um ambiente indutivo correto para que a diferenciação possa ocorrer (FRESHNEY, 1990).

In vivo, o osteoblasto é uma célula que sintetiza matriz extra-celular passível de sofrer mineralizações. A parte orgânica da matriz óssea é composta 90% por colágeno Tipo I e 10% por proteínas não colagênicas como a osteonectina e a sialo-proteína óssea.

No meio de cultura, para que ocorra proliferação contínua de células precursoras indiferenciadas e para serem caracterizadas como osteoblásticas, há a necessidade de um ambiente indutivo correto para que a diferenciação celular possa ocorrer, ou seja, a síntese da fase orgânica da matriz extra-celular e sua posterior mineralização.

Assim, baseado em estudos anteriores (ECAROT-CHARRIER et al., 1983; BELLOWS et al., 1986; MANIATOPOULOS et al., 1988; DEBONI, JAEGER, ARAÚJO, 1996) propuseram, igualmente suplementar o meio de cultura básico (DME + 10% de Soro Fetal Bovino + 1% solução antibiótica) com Ácido Ascórbico (50µg/ml), β-glicerofosfato de sódio (10mM) e Dexametasona (10^{-3} M diluída em etanol).

Justifica-se esta suplementação com três diferentes substâncias no meio de cultura pelo fato de favorecer a morfo e cito-diferenciação das células com as respectivas sínteses de matriz extra-celular e sua posterior mineralização: a) o Ácido Ascórbico (Vit.C) é essencial para o desenvolvimento do tecido ósseo como de todos os tecidos conjuntivos. Como a Vit C não é sintetizada pelo organismo a sua suplementação exógena é importante no meio de cultura, pois participa juntamente com o oxigênio, íons-ferro, piruvatos e enzima colágeno oxidase, na hidroxilação dos resíduos de prolina para hidroxiprolina na síntese do colágeno (DEBONI, JAEGER, ARAÚJO, 1996). A concentração de 50µg/ml é preconizada por Bellows et al. (1986) e Maniatopolous et al. (1988) que demonstram que culturas de células

osteoblásticas na ausência de ascorbatos não exibiam formação de nódulos calcificados; b) a fase inorgânica do tecido ósseo, *in vivo*, é composto na sua maior parte por hidroxiapatita, um fosfato de cálcio (EASTOE, 1976). Assim, para obtenção dessa fase inorgânica *in vitro*, os níveis de cálcio e fosfato devem estar apropriados no meio de cultivo. A maioria das formulações de meio nutrientes para cultivo apresenta níveis de cálcio apropriados, entretanto os níveis de fosfato orgânico são deficientes (DEBONI, JAEGER, ARAÚJO, 1996). Como a fração de fosfato orgânico existente no soro fetal bovino não é suficiente para promover mineralizações em cultura de células osteoblásticas (ECAROT-CHARRIER, 1983), a suplementação do meio de cultura com 10mM de β -glicerofosfato de sódio (DEBONI; JAEGER; ARAÚJO, 1996) ou Naglyglicerofosfato 10nmol/L (LI; LUI; WU, 2001) propiciará a formação de depósitos minerais; c) o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico é dependente de muitos fatores presentes no soro fetal; sendo os glicocorticóides um grupo destes fatores que podem promover a diferenciação celular, por regulação da sua expressão genética (MANIATOPOULOS et al., 1988), ou seja, propiciam modificações fenotípicas das células na cultura que pode originar linhagem de células homogêneas. O acréscimo de um glicocorticóide como por exemplo dexametasona em um concentração variável de 10^{-8} M e 10^{-7} M no meio de cultura, pode promover a diferenciação de células progenitoras em osteoblastos (MANIATOPOULOS et al., 1988) como também, pode aumentar a formação de nódulos calcificados em cultura (BELLOWS et al., 1986). Concentrações maiores do que 10^{-8} M podem atuar sinergicamente com esteróides contidos no soro fetal bovino e causar efeitos inibitórios no meio e cultura.

Anteriormente ao processo indutivo (10 aos 15 primeiros dias) as células cultivadas osteoprogenitoras e osteoblásticas apresentavam-se fusiformes e bipolares com aspecto morfológicos semelhantes a fibroblastos comuns sem nenhuma espécie de mineralização. Com o processo indutivo (11° ao 16° dia), paulatinamente essas células passarão apresentar-se mais poligonais com núcleos grandes e centrais e com citoplasma ampla e rico em grânulos, visíveis ao microscópio de fase invertido.

Estas células tendem a agrupar-se formando grupamentos tri-dimensionais compostos por várias camadas celulares. Nestes grupamentos deverá ocorrer deposição de substâncias minerais formando nódulos mineralizados (calcificados) após 10 dias da indução (por volta do 25° ao 30° dia). Portanto, as células osteoprogenitoras e osteoblásticas depois de induzidas deverão mostrar-se capazes de desenvolver função específica básica do osteoblasto que é a

produção de matriz óssea, seguida de processo de mineralização (nódulos mineralizados) (DEBONI; JAEGER; ARAÚJO, 1996). Toda esta observação é realizada através de microscopia de fase invertida. Culturas mais velhas com mais de 40 dias mostram, além de células poligonais, células de aspecto dentrífico cujos prolongamentos celulares interdigitam-se com os de outras células lembrando os osteócitos *in vivo* (NIJWEIDE e MULDER, 1986). A linhagem osteo-1, osteoblásticas e osteoprojenitoras, como outras linhagens celulares apresentaram ciclo de vida finito, ou seja, após algumas passagens sofre senescência e morte (JAEGER et al., 1995).

7 CONCLUSÕES

Considerando a impossibilidade de utilização de recursos de laboratório e de corpo técnico disponível, e tendo por base experimentos e revisão bibliográfica, conclue-se que, através do protocolo proposto, é possível avaliar *in vitro*, em culturas de células osteoprogenitoras e células osteoblásticas provenientes de maxilares humanos, o crescimento e adesão celulares frente às diferentes rugosidades na superfície das amostras dos cilindros de titânio seccionados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ALBREKTSSON, T. Direct bone anchorage of dental implants. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.50, n.2, p.255-261, Aug. 1983.

ALBREKTSSON, T. et al. Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting direct bone-to-implant anchorage in man. **Acta Orthop. Scand.**, Oslo, v.52, n.2, p.155-170, 1981.

ALBREKTSSON, T.; HANSON, H.A. An ultrastructural characterization of the interface between bone and sputtered titanium or stainless steel surfaces. **Biomaterials.**, Oxford, v.7, n.3, p.201-205, May 1986.

ALBREKTSSON, T.; JACOBSSON, M. Bone-metal interface in osseointegration. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.57, n.5, p.597-607, May 1987.

ALBREKTSSON, T.; SENNERBY, L. Direct bone anchorage of oral implants: clinical and experimental considerations of the concept of osseointegration. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v.3, n.1, p.30-41, Jan./Fev. 1990.

ALBREKTSSON, T.; SENNERBY, L. State of the art in oral implants. **J. Clin. Periodontol.** Copenhagen, v.18, n.6, p.474-481, July 1991.

BABBUSH, C. A. Titanium plasma spray screw implant system, for reconstruction of the edentulous mandible. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.30, n.1, p.117-131, Jan. 1986.

BAIER, R.E. et al. Degradative effects of conventional steam sterilization on biomaterial surfaces. **Biomaterials.**, Oxford, v.3, n.4, p.241-245, Oct. 1982.

BAIER, R.E. et al. Surface properties determine bioadhesive outcomes methods and results. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.18, n.4, p.337-355, Apr. 1984.

BAIER, R.E.; MEYER, A.E. Future directions in surface preparation of dental implants. **J. Dent. Educ.**, Washington, v.52, n.12, p.788-791, Dec. 1988.

BELLOWS, C.G. et al. Mineralized bone nodules formed *in vitro* enzymatically released rat calvaria cell populations. **Calcif. Tissue Int.**, New York, v.38, n.3, p.143-154, Mar. 1986.

BELLOWS, C.G.; HEERSCHKE, J.N.M.; AUBIN, J.E. Inorganic phosphate added exogenously or release from β -glycerophosphate initiates mineralization of osteoid modules *in vitro*. **Bone Miner.**, Limerick, v.17, n.1, p.15-29, Apr. 1992.

¹ Baseada na ABNT 10520, Julho 2001.

BOBYAN, B.D. et al. Effect of surface roughness and composition on Costochondral chondrocytes is dependent on cell maturation state. **J. Orthop. Res**, New York, v.17, n.3, p.446-457, may 1999.

BOEHS, K.; STEIDEL, P.S; FRIEDRICH, D.. Influência dos parâmetros de usinagem e da geometria da ferramenta sobre a rugosidade cinemática e de processo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA MECÂNICA, 2001, Uberlândia. **Anais Eletrônicos**, Uberlândia: UFU, 2001. Disponível em: <http://www.cobem.mecanica.ufu.br/anais/anais.htm>. Acesso em: 6 ago 2001.

BOWERS, K.T. et al. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses *in vitro*. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v.7, n.3, p.302-310, Mar. 1992.

BREEMHAAR, W. Preferential adsorption of high density lipoprotein from blood plasma onto biomaterial surfaces. **Biomaterials**, Oxford, v.5, n.5, p.269-274, sept. 1984.

BRUNETTE, D.M. The effect of implant surface topography on the behavior of cells. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v.3, n.4, p.231-246, Apr. 1988.

BRUNSKI, J.B. Biomechanics of oral implants: future research directions. **J. Dent. Educ.**, Washington, v.52, n.12, p.775-787, Dec. 1988.

BUCHAMAN, R.A.; LEE, I.S.; WILLIAMS, J.M. Surface modification of biomaterial through noble metal ion implantation. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.24, n.3, p.309-318, Mar. 1990.

BUSER, D. et al. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants: a histomorphometric study in miniature pigs. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.25, n.7, p.889-902, July 1991.

BUSER, D. et al. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v.13, n.5, p.611-619, May 1998.

CALLEN, B.W. et al. Nitric acid passivation Ti-6Al-4V reduces thickness of surface oxide layer and increases trace element release. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.29, n.3, p.279-290, Mar. 1995.

CAMPOS JÚNIOR, A.; PASSANEZI, E. Por que a osseointegração revolucionou a implantodontia. In: TODESCAN, F.F.; BOTTINO, M.A. **Atualização na clínica odontológica: a prática da clínica geral**. São Paulo: Artes Médicas, 1996. cap.11, p.249-297.

CARLSSON, L. et al. Removal torques for polished and rough titanium implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v.3, n.1, p.21-24, Spring 1988.

CARTER, J.M. et al. Organic surface film contamination of titanium implants. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.15, n.6, p.843-851, Nov. 1981.

CARTER, S.B. Principles of cell motility: the direction of cell movement and cancer invasion. **Nature**, London, v.208, n.516, p.1183-1187, Dec. 1965.

CHEHROUDI, B.; GOULD, T.R.L.; BRUNETTE, D.M. Effects of a grooved titanium – coated implant surface on epithelial cell behavior *in vitro* and *in vivo*. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.23, n.9, p.1067-1085, Sept. 1989.

CHEHROUDI, B.; GOULD, T.R.L.; BRUNETTE, D.M. Titanium-coated micromachined grooves of different dimensions affect epithelial and connective-tissue cells differently *in vivo*. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.24, n.9, p.1203-1219, Sept. 1990.

CHEHROUDI, B.; GOULD, T.R.L.; BRUNETTE, D.M. The effects of micromachined surfaces on formation of bone like tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing. **J. Biomed Mater Res.**, New York, v.34, n.3, p.279-290, mar. 1997.

CLEMOV, A.J.T. et al. Interface mechanics of porous titanium implants. **J. Biomed Mater Res**, New York, v.15, n.1, p.73-82, jan. 1981.

COCHRAN, D.L. et al. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. **J. Biomed Mater Res**, New York, v.40, n.1, p.1-11, apr. 1998.

DALTON, B.A. et al. Modulation of epithelial tissue and cell migration by microgrooves. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.56, n.2, p.195-207, Aug. 2001.

DAMEN, J.J.; TEN CATE, J.M.; ELLINGSEN, J.E. Induction of calcium phosphate precipitation by titanium dioxide. **J. Dent. Res.** Washington, v.70, n.10, p.1349-1349, Oct. 1991.

De SANTIS, D. et al. Adult human bone cells from jaw bones cultured on plasma-sprayed or polished of titanium or hidroxyapatite discs. **J. Mater. Sci.**, v.7, p.21-28, 1996.

DEBONI, M.C.Z.; JAEGER, M.M.M.; ARAÚJO, N.S. de. Obtenção e caracterização de linhagem de células osteoblásticas. **RPG: ver pós-grad.**, São Paulo, v.3, n.3, p.220-229, jul./set. 1996.

DOUNDOULAKIS, K.H. Surface analysis of titanium after sterilization: role in implant-tissue interface and bioadhesion. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.58, n.4, p.471-478, Oct. 1987.

EASTOE, J.E. The composition and chemical dynamics of bone. In: COHEN, N.; KRAMER, I.R.H. **Scientific foundation of dentistry.**, Chicago: W Heinemann books, 1976; p.553-565.

ECAROT-CHARRIER, B. et al. Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiated matrix mineralization in culture. **J. Cell. Biol.**, New York, v.96, n.3, p.639-643, Mar. 1983.

EFFAH, E.A.; BIANCO, P.D.; DUCHEYNE, P. Crystal structure of the surface oxide layer on titanium and its changes arising from immersion. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.29, n.1, p.73-80, Jan. 1995.

ELLINGSEN, J.E. Surface configurations of dental implants. **Periodontol.** 2000, Copenhagen, v.17, p.36-46, June 1998.

- FRESHNEY, R.I. Biology of the cultured cell. In: FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells**. A manual of basic technique. [S.L.]: Wisley-Liss, 1990. p.63-80.
- GAMMAGE, D.D. et al. A histologic and scanning electron micrographic comparison of the osseous interface in loaded IMZ and integral implants. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, Chicago, v.10, n.2, p.125-135, Mar./Apr. 1990.
- GOTTLANDER, M. et al. Bone tissue reactions to an electrophoretically applied calcium phosphate coating. **Biomaterials.**, Oxford, v.18, n.7, p.551-557, Apr. 1997.
- GOULD, T.R.I.; BRUNETTE, D.M.; WESTBURY, L. The attachment mechanism of epithelial cells to titanium *in vitro*. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v.16, n.6, p.611-616, Nov./Dec. 1981.
- GROSS, U.M. Biocompatibility: the interaction of biomaterials host response. **J. Dent. Educ.**, Washington, v.52, n.12, p.798-803, Dec. 1988.
- HANSSON, H.A.; ALBREKTSSON, T.; BRÄNEMARK, P.I. Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.50, n.1, p.108-113, July 1983.
- HAYASHI, E. et al. Effect of surface roughness of hydroxyapatite-coated titanium on the bone implant interface shear strength. **Biomaterials**, Oxford, v.15, n.14, p.1187-1911, nov. 1994.
- INQUE, T. et al. Implant-bone tissue interface. **Bull. Tokio Dent. Coll.**, Tokio, v.27, n.2, p.132-141, Sept. 1999.
- JAEGER, R.G. et al. Analysis of the interdependent localization of Vimentin and microtubules in neoplastic myoepithelial cells. **Cell motil cytoskel**, New York, v.32, n.4, p.289-296, dec. 1995.
- JOHANSSON, C. et al. Ultrastructural differences of the interface zone between bone and Ti-Gal-4V or commercially pure titanium. **J. Biomed. Eng.**, Guildford, v.11, n.1. p.3-8, Jan 1989.
- JOHANSSON, C.B.; SENNERBY, L.; ALBREKTSSON, T.A. A removal torque and histomorphometric study of bone tissue reations to commercially pure titanium and vitallium implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v.6, n.4, p.437-441, Winter 1991.
- KASEMO, B. Biocompatibility of titanium implants surface science aspects. **J. Prosthet Dent.**, St. Louis, v.49, n.6, p.832-837, June 1983.
- KASEMO, B.; LAUSMAA, J. Biomaterials and implant surfaces: a surface science approach. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v.3, n.4, p.247-259, Winter 1988.
- KELLER, J.C. et al. A simplified model for studying bone ingrowth. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v.2, n.3, p.149-152, Summer 1987.
- KELLER, J.C. et al. Characterization of titanium implant surface III. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.28, n.8, p.939-946, Aug. 1994.

- KELLER, J.C.; GROTENDORST, G.R.; DOUGHERTY, W.J. Cell attachment to sterilized ipiti surfaces. **J. Dent. Res.**, Washington, v.68, p.276, Mar. 1989. Abstract 757.
- KIPALDI, D; LEMONS, J. Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.28, n.12, p.1419-1425, Dec. 1994.
- KÖNÖNEN, M. et al. Effect of surface processing on the attachment, orientation and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.26, n.10, p.1325-1341, Oct. 1992.
- LARSSON, C. et al. Bone response to surface modified titanium implants: studies on electropolished implants with different oxide thicknesses and morphology. **Biomaterials.**, Oxford, v.15, n.13, p.1062-1074, Oct. 1994.
- LARSSON, C. et al. Bone response to surface modified titanium implants: studies on electropolished implants with different oxide thicknesses and morphology. **Biomaterials.**, Oxford, v.17, n.6, p.605-616, Mar. 1996.
- LI, D.; LIU, B.; WU, J. Interface ossea de implantes citologicamente influenciada por uma superfície modificada por jato de areia: um estudo preliminar *in vitro*. **Int. J. Oral Implantol.**, New York, v.10, n.11, p.65-70, 2001.
- LIMA, J.H.C. et al. Análise da superfície de implantes osseointegrados. **RBO.**, Rio de Janeiro, v.3, n.4, p.48-51, jul./ago. 1996.
- LINCKS, J. et al. Response of MG63 osteoblast like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. **Biomaterials.**, Oxford, v.19, n.23, p.2219-2232, Dec. 1998.
- LINDER, L. et al. Electron microscopic analysis of the bone titanium interface. **Acta Orthop. Scand.**, Oslo, v.54, n.1, p.45-52, Feb. 1983.
- MAGINI, R. de S. **Análise comparativa do comportamento de implantes de Ti c.p. com diferentes meios de armazenagem. Análises microscópicas e torque de remoção.** Bauru, São Paulo, Dissertação (Doutorado em Odontologia – Área de Concentração: Periodontia), 1997.
- MANIATOPOLOUS, C.; SODEK, J.; MECHER, A.H. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. **Cells Tissue Res.**, New York, v.254, n.3, p.317-330, Dec. 1988.
- MARTIN, J.Y. et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation and protein synthesis of human osteoblast-like cells. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.29, n.3, p.389-401, Mar. 1995.
- McKINNEY, R.V. et al. The scientific basis for dental implant therapy. **J. Dent. Educ.**, Washington, v.52, n.12, p.696-705. Dec. 1988.
- MEYLE, J.; GÜLTIG, K.; NISH, W. Variation in contact guidance by human cells on a microstructured surface. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.29, n.1, p.81-88, Jan. 1995.

- MICHAELS, C.M. et al. In vitro connective tissue cell attachment to cpTi. **J. Dent. Res.**, Washington, v.68, n.759, p.276, 1989. Abstract.
- MURRAY, D.W.; RAE, T. RUSHTON, N. The influence of the surface energy and roughness of implants on bone resorption. **J. Bone Joint Surg Br.**, Boston, v.71, n.4, p.632-637, aug. 1989.
- NIJWEIDE, P.J.; MULDER, R.J. Identification of osteocytes in osteoblast-like cell cultures using a monoclonal antibody specifically directed against osteocytes. **Histochemistry.**, Belfast, v.84, n.46, p.342-347, 1986.
- OLEFJORD, I.; HANSSON, S. Surface analysis of four dental implants systems. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v.8, n.1, p.32-40, 1993.
- ORSINI, G. et al. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. **Int J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v.15, n.6, p.779-784, June 2000.
- PACKLO, H.E. et al. Surface characterization titanium-based implant. **Int J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v.15, n.3, p.355-363, Mar. 2000.
- PERALA D.; CHAPMAN, R.; GELFAND, J. Complement activation by dental implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v.6, n.2, p.136-142, Spring 1991.
- PIATELLI, A.; TRISI, P.; EMANUELLI, M. Bone reactions to hidroxyapatite-coated dental implants in humans histologic study using SEM, light microscopy and laser scanning microscopy. **Int. J. Maxillofac. Implants.**, Lombard, v.8, n.1, p.69-74, Jan. 1993.
- PIATELLI, A. et al. Histologic and histomorphometric analysis of bone response to machined and sand blasted titanium implants: an experimental study in rabbits. **Int J. Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v.13, n.6, p.805-810, nov/dez. 1998.
- PIATTELLI, A.; TRISI, P.; EMANUELLI, M. Bone ingrowth into hydroxyapatite coating: a light microscopy and laser scanning microscopy study. **Biomaterials.**, Oxford, v.14, n.13, p.973-977, Oct. 1993.
- PILLIAR, R.M. et al. Dental implant design-effect on bone remodelling. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.25, n.4, p.467-483, Apr. 1991.
- PROUSSEFS, P.T. et al. Histologic evaluation of hidroxyapatite-coated root-form implants retrieved after 7 years in function: a case report. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v.15, n.3, p.438-443, Mar. 2000.
- RATNER, B.D.; JOHNSTON, A.B.; LENK, T.J. Biomaterial surfaces. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.21, n.A1, p.59-90, Apr. 1987.
- RICH, A.; HARRIS, A.K. Anomalous preferences of cultured macrophages for hydrophobic and roughened substrata. **J. Cell Sci.**, Cambridge, v.50, p.501-507, Aug. 1981.
- RUANO, R.; JORGE, A.G.; JAEGER, M.M.M. Estudo *in vitro* da biocompatibilidade da hidroxiapatita utilizada em implantodontia. **RPG**, São Paulo, v.3, n.2, p.135-141, abr./jun. 1996.

SCHMIDT, C; IGNATIUS, AA.; CLAES, L.E. Proliferations and differentiation parameters of human osteoblasts on titanium and steel surfaces. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.54, n.2, p.209-215, Feb. 2001.

SIQUEIRA, J.T.T.; DIAS, P.V. Implantes de titânio, cilíndricos com superfície rugosa por jateamento: considerações clínicas e histológicas. **Ver. Bras. Implant.**, Rio de Janeiro, v.2, n.5, p.7-11, set./out. 1996.

SMITH, D.C. Future directions for research on materials and design of dental implants. **J. Dent. Educ.**, Washington, v.52, n.12, p.815-820, Dec. 1988.

SMITH, D.C.; PILLIAR, R.M.; CHERNECKY, R. Dental implant materials I: some effects of preparativa procedures on surface topography. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.25, n.9, p.1045-1068, Sept. 1991.

SUTTER, F.; SCHROEDER, A.; BUSER, D.A. The new concept of ITI hollow-cylinder and hollow-screw implants: part 1. Engineering and design. **Int. J. Oral Maxillofac Implants.**, Lombard, v.3, n.3, p.161-172, Mar 1988.

SCHWARTZ, Z. et al. Direct effects of transformine growth factor-beta on chondrocytes are modulated by vitamim D in a cell maturation – specific manner. **Endocrinol.**, Baltimore, v.132, n.4, p.1544-1552, April 1993.

SCHWARTZ, Z. et al. Effect of titanium surface roughness on chondroxyte proferation matrix production, and differentiation depends on the state of cel maturation. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.30, n.2, p.145-155, Feb. 1996.

SYKARAS, N. et al. Implant materials, design and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. **Int. J. Maxillofac. Implants.**, Lombard, v.15, n.5, p.675+690, Sept./Oct. 2000.

TEIXEIRA, R.T. Superfícies dos implantes: o estágio atual. In: DINATO, J.C.; POLIDO, V.D. **Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2001, 529p., p.63-80.

TOGASHI, A.Y. **Análise da rugosidade de superfície obtida pela usinagem de implantes**. Florianópolis: UFSC, Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração: Implantodontia), 2001.

THOMA, K.A; COOK, S.D. New evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.19, n.3, p.875-201, Mar. 1985.

TRACY, B.M.L DOREMUS, R.H. Direct electron microscopy studies of the bone hydroxiapatite interface. **J. Biomed Mater Res.**, New York, v.18, n.7, p.719-726, Sept. 1984.

UNIYAL, S.; BRASH, J.S. Patterns of absorption of proteins form human plama onto foreign surfaces. **Trombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.47, n.3, p.285-290, Jan. 1982.

VERCAIGNE, S. et al. Bone healing capacity of titanium plasma-sprayed and hydroxylapatite-coated oral implants. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.9, n.4, p.261-271, Aug. 1998a.

VERCAIGNE, S. et al. The effect of titanium plasma-strayed implants on trabecular bone healing in the goat. **Biomaterials**, Oxford, v.19, n.11, p.1092-1099, June 1998b.

VON RECUM, A.F.; VON KOOTEN, T.G. The influence of microtopography on cellular response and ten implications for silicone implants. **J. Biomed Sci. Polym. Ed.**, Utrech, v.7, p.181-198, 1995.

WEINLAENDER, M. et al. Histomorphometry of bone apposition around three types of endosseous dental implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v.7, n.4, p.491-496, Winter 1992.

WENNERBERG, A. et al. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.6, n.1, p.24-30, Mar. 1995.

WENNERBERG, A. et al. Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implantas with emphasis on effects of blasting material and surface topography. **Biomaterials.**, Oxford, v.17, n.1, p.15-22, Jan. 1996.

WENNERBERT, A. et al. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. **Clin Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.9, n.1, p.11-19, Feb. 1998.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. **Int J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v.15, n.3, p.331-344, Mar. 2000.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. ANDERSSON, B. Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminium oxide. **Int. J. Oral Maxillofac.**, Lombard, v.11, n.1, p.38-45, Jan./Fev. 1996.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T.; LAUSMAA, J. Torque and histomorphometrial evaluation of cp titanium screws blasted with 25 and 75 μ m size particles of Al₂O₃. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.30, n.2, p.251-260, Feb. 1996.

WIESTNER, M. et al. Collagem types synthesized by isolated calvarium cells. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v.133, n.1, p.115-125, May 1981.

WONG, M. et al. Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.29, n.12, p.1567-1575, Dec. 1995.

WOODMAN, J.L. et al. Metal ion release from titanium-based segmental replacements of long bones in baboons: a long-term study. **J. Orthop. Res.**, New York, v.1, n.4, p.421-430, 1984.

WORTHINGTON, P. Current implant usage. **J. Dent. Educ.**, Washington, v.52, n.12, p.692-695, Dec. 1988.

YANG, R.S. et al. Morphological and imunocytochenical characterization of osteoblast cultures from long bone of neonatal rats. **Arch. Histol. Cytol.**, Niigata, v.55, n.4, p.415-422, Apr. 1992.

YOUNG, F.A. Future directions in dental implant materials research. **J. Dent. Educ.**, Washington, v.52, n.12, p.770-774, Dec. 1988.