

Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico

Kely Cristina de Moraes

**Avaliação do comportamento de uma linhagem de osteoblasto na
presença de superfícies de titânio submetidas a diferentes tratamentos:
análise *in vitro*.**

CURITIBA
2014

Kely Cristina de Moraes

Avaliação do comportamento de uma linhagem de osteoblastos na
presença de superfícies de titânio submetidas a diferentes tratamentos:
análise *in vitro*.

Dissertação apresentada ao Instituto Latino
Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico,
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Odontologia, área de concentração
Implantodontia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcela Claudino

CURITIBA
2014

Moraes, Kely Cristina de.

M827a Avaliação do comportamento celular na presença de superfícies de titânio submetidas a diferentes tratamentos: análise *in vitro*. Curitiba, 2014.

116f. : il. ; 31cm

Dissertação (mestrado) – Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico – Programa de Pós - Graduação em Odontologia - Área de Concentração: Implantodontia. Curitiba, 2014

Orientadora: Profa. Dra. Marcela Claudino.

Bibliografia

1. Osseointegração. 2. Implantes Dentários. 3. Molhabilidade. 4. Titânio. I. Título.

Kely Cristina de Moraes

Avaliação do comportamento de uma linhagem de osteoblasto na presença de superfícies de titânio submetidas a diferentes tratamentos: análise *in vitro*.

Presidente da Banca (Orientadora): Prof^ª. Dr^ª. Marcela Claudino

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^ª. Ana Cláudia Moreira Melo

Prof. Dr. Eduardo Baulm Campagnoli

Aprovada em: 15/12/2014

Dedicatória

Ao meu esposo Oséias Gomes...

A você que, por muitas vezes permitiu que tratados e compêndios substituíssem seu ósculo de amor pelo complexo do conhecimento. Que me ofertou não só odes de incentivo, mas, seu próprio exemplo de certeza e fé em minha vida incondicional. A você, luz no crepúsculo de minhas claudicações, e no alvorecer de meu sucesso, meu muito obrigada. Obrigada, por cobranças que me ensinam a crescer, por palavras de incentivo que não me deixam olhar para trás, mas contribuem certamente para prosseguir nesta jornada. Obrigada por tentar ostigar-me a ponto de eu descobrir o potencial que existe em mim, e por acima de tudo, ensinar-me a ser feliz. A você Oséias, não mais que com justiça, eu dedico esta vitória. Amo você...

A minha filha Emanuely Gomes de Moraes...

Razão do meu viver, sempre tendo paciência na minha vida acadêmica desde que veio à este mundo. O carinho da sua voz, a esperança do teu sorriso, o brilho do teu olhar me motiva cada dia cuidar de você. Amo você...

Aos meus pais Disonê Alves Machado e Léia Tâmilim Machado...

De vocês recebi o dom mais precioso do universo: a VIDA. Inspiraram-me a certeza de sua presença e a segurança de seus passos guiando os meus. Seus cuidados, atenção e excesso de preocupação durante estes 24 meses me faz vivenciar o quão grande é o vosso amor por mim. Se eu pudesse-vos fazer eterno... eterno eu os faria. Amo vocês...

Agradecimentos

A Deus...

Pela presença em cada momento da minha vida, pela luz que ilumina meu caminho. Por me abençoar preservando minha saúde física e mental. Por me proteger a cada viagem, e me fortalecer a cada dia. Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. Hoje a vitória é minha, e a Ti, meu Deus, toda a honra e glória, eternamente amém...

Ao Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico – ILAPEO, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Geninho Thomé, pela oportunidade concedida para a realização do curso de Mestrado. Você é um exemplo de coragem, ousadia e determinação. Podemos dizer que tomamos carona na carruagem dos seus sonhos...

A Prof^a Dr^a. Ivete Aparecida de Mattias Sartori, pela oportunidade e incentivo na realização do curso de Mestrado. Obrigada pela simpatia e pelo entusiasmo ao ensinar e ao conduzir o curso, repassando seus conhecimentos com tanta satisfação e de maneira acessível. Obrigada por seu apoio que não poupou esforços na minha entrada ao meio acadêmico. Obrigada pelo imenso apoio concedido e pelo amor que demonstra sempre em tudo o que faz, deixando transparecer pelo exemplo da sua determinação e dedicação. Sempre digo que quando eu crescer quero ser como você... Minha gratidão vai além dos meus sentimentos, pois você certamente cumpriu com o dom divino do ensino...

A minha orientadora, Prof^a Marcela Claudino pela dedicação, talento e humildade. Obrigada pela paciência com que me atendeu desde o primeiro momento de orientação, respeitando e entendendo os meus limites. Estas atitudes aumentam minha admiração por sua pessoa. Obrigada pela sua postura humilde e de compreensão para comigo, permitindo meu amadurecimento e incentivando minha formação acadêmica. Obrigada pela obstinação em buscar conhecimento científico e senso crítico inquestionável contribuindo para um curso de excelência em odontologia. Pois na habilidade do mestre que ensina, vem a esperança do semeador. A você meu sincero obrigada...

Prof^a Dra. Ana Claudia M. Melo que sempre demonstrou simpatia, sabedoria, dinamismo e conduta correta na busca incansável pela descoberta em favor da ciência, contribuindo para o desenvolvimento técnico, científico e pessoal de todos nós como profissionais. Minha gratidão pelos votos de confiança e pela disposição em sempre ajudar.

Ao Prof^o Luiz Eduardo Marques Padovan, Sérgio Rocha Bernardes, Leandro Eduardo Kluppel, Jacques Luiz, Rogéria Acedo Vieira, Flávia Noemy Gasparini Kiatake Fontão, Roberto Hideo Shimizu, Augusto Ricardo Andrighetto, Caio Hermann, Flávio Bortolozzi, obrigada pela maneira descontraída e bem humorada em nos incentivar a prosseguir. Obrigada pelo aprendizado, amizade e atenção durante todo o nosso convívio.

Aos parceiros de Clínica Alberto Gurgel e Celso Hochscheidt obrigada pelo aprendizado na convivência destes 24 meses.

Em especial ao Alberto pela paciência e apoio, você me inspirou no modelo de profissional que almejo ser, pela sua conduta correta, profissionalismo e apaixonado pelo que faz. Obrigada de coração...

Aos Colegas do curso Bruna, Bruno, Eduardo, Fernando Henrique, Fernando Peres, Marcelo, Marcos, Paulo e Rafael pelo apoio, encorajamento e amizade.

A Equipe do departamento de radiologia e auxiliares do ILAPEO que contribuíram muito para o desenvolvimento do curso mestrado.

A bibliotecária Luciana Cardoso da Cunha Debiasi pela dedicação, incentivo, seriedade e empenho.

A todos os funcionários do ILAPEO, pela dedicação, seriedade e respeito ao

realizarem seu trabalho.

Aos pacientes, obrigada por depositarem confiança em nosso trabalho, pela paciência e colaboração.

A Empresa Neodent, pelo apoio e incentivo na pesquisa e a doação dos materiais desta pesquisa.

Ao Laboratório Prótese pelo profissionalismo.

A UFPR, UEPG e PUC-PR, obrigada pelo apoio a esta pesquisa.

A todos posso dizer: Muito Obrigada!!

Sumário

Listas

Resumo

1. Introdução.....	13
2. Revisão de Literatura.....	16
3. Proposição.....	40
4. Materiais e Métodos.....	41
5. Artigo Científico.....	50
6. Referências.....	80
7. Apêndice.....	85
8. Anexos.....	115

Lista de Figuras

Figura 1 – Figura ilustrando as 4 regiões de cada disco e as quantidades de amostras de cada superfície.....	42
Figura 2 – Proliferação de células da linhagem osteoblástica nos frascos de cultura previamente ao plaqueamento.....	43
Figura 3 – Estufa incubadora com frascos e placas de cultura celular.....	44
Figura 4 – Microscópio óptico invertido para monitoramento da cultura celular.....	44
Figura 5 – Procedimento de centrifugação para obtenção do Pellet de células.....	45
Figura 6 – Avaliação quantitativa das células com uso de hemocitômetro (Câmara de Neubauer).....	47

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

BIC - Bone-implant contact (contato osso-implante)

EDS - Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (espectroscopia de energia dispersa)

EMC - Extracellular Matrix (matriz extracelular)

ESCA - Electron Spectroscopy for Chemical Analysis (espectroscopia eletrônica)

FN - fibronectin (fibronectina)

HEPM - Human embryonic palatal mesenchymal cells (célula osteoblástica embrionárias mesenquimais palatal)

HF - Fluorhidric Acid (ácido fluorídrico)

hMSCs - Human mesenchymal stem cells (células-tronco mesenquimais humanas)

HOS - Human osteosarcoma cell (células derivadas de osteosarcoma humano)

MEV - Scanning electron microscopy (microscopia eletrônica de varredura)

MG63 – Osteoblast-like MG-63 cells (células osteoblasticas MG-63)

NBF- New bone formation (nova formação óssea)

Ncm - newton centimeter (newton centímetro)

Ra – Average Roughness (rugosidade média)

RBM - Resorbable blast media (jateamento com partículas cerâmicas de fosfato de cálcio)

rhBMP-7 - Bone morphogenetic protein 7 (proteína morfogenética recombinante humana-7)

RTV - Removal torque values (valor de torque de remoção)

RGD - arginine glycine aspartic acid (ácido arginina glicina aspártico)

Saos-2 - Homo sapiens bone osteosarcoma (osteoblasto osteossarcoma humano)

SEM - Scanning electron microscopy (microscópio eletrônico de varredura)

SLA - Sandblasted and acid-etched (superfície jateada e duplo ataque ácido)

SLActive - Chemically modified sandblasted and acid-etched (superfície jateada, duplo ataque ácido e modificada quimicamente)

TGF- β - Transforming growth factor beta (fator de crescimento celular beta)

TN - Tenascin (tenascina)

TPS - Titanium plasma-sprayed (titânio plasma spray)

XPS - Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X (spectroscopia de raio X)

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento celular na viabilidade, adesão celular e a atividade da fosfatase alcalina em culturas de células na presença de discos de titânio submetidos a diferentes tratamentos de superfícies. Foram utilizados superfície lisa (grupo L) como grupo controle, superfícies submetidos ao jateamento e ataque ácido (grupo Jat) e submetidos ao tratamento de superfície para aumento na molhabilidade (grupo Mol). A topografia da superfície foi analisada por MEV, a composição química foi avaliada por EDS e a rugosidade foi mensurada utilizando microscopia confocal. Células de rato de linhagem osteoblásticas ROS 17/2.8 foram cultivadas sobre os discos e avaliados após períodos diferentes períodos. A viabilidade e adesão celular foram avaliados pelo método colorimétrico MTT após 7 e 14 dias. A atividade da fosfatase alcalina analisada após 7 dias, foi mensurada avaliando a quantidade de liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato. A análise estatística foi realizado pelo teste de análise de variância ANOVA e teste de Turkey. Os resultados mostraram que nos ensaios da viabilidade e adesão celular não houve diferença entre as superfícies (Jat e Mol) analisadas após 7 dias e 14 dias, porém, foi observado uma tendência a aumento na viabilidade nos discos com aumento de molhabilidade (grupo Mol) após 14 dias. Os ensaios de adesão celular, índices maiores foram observados nos discos grupo (Jat) com diferenças estatísticas em relação ao grupo (L) ($p < 0,001$). A atividade da fosfatase alcalina não revelou diferenças estatísticas significativas em todos os grupos. Concluímos que o tratamento de superfície resultou em aumento da rugosidade superficial, além disso, superfícies com aumento da molhabilidade otimizaram o comportamento celular resultando em aumento da viabilidade, entretanto, não houve diferenças estatísticas na adesão celular entre os grupos Jat e Mol para a linhagem osteoblásticas analisada.

Palavras-chave: Osseointegração, Implantes Dentários, Molhabilidade, Titânio.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the behavior of cells on viability, cell adhesion and the alkaline phosphatase activity in cell cultures in the presence of titanium discs under different surface would treatments. Smooth surface were used (group L) as a control group, surfaces subjected to blasting and etching (Jat group) and subjected to surface treatment for increasing the wettability (Mol group). The surface topography was examined by SEM, the chemical composition was assessed by EDS and the surface roughness was measured using confocal microscopy. Line of mouse cells osteoblastic ROS 17 / 2.8 were grown on discs and evaluated after periods different periods. The viability and cell adhesion were evaluated by MTT colorimetric method after 7 and 14 days. The alkaline phosphatase activity assessed after 7 days was measured by evaluating the amount of thymolphthalein release by hydrolysis of the substrate thymolphthalein monophosphate. Statistical analysis was performed by ANOVA and Tukey test test. The results showed that in the tests of cell viability and adhesion there was no difference between the surfaces (Jat and Mol) analyzed after 7 days and 14 days, however, a tendency to increase in viability was observed in disks with increased wettability (Mol group) after 14 days. Testing of the cell adhesion, the highest rates were observed in the group drives (Jat) with statistical difference in the group (L) ($p < 0.001$). The activity of alkaline phosphatase revealed no statistically significant differences in all groups. We conclude that the surface treatment resulted in increased surface roughness, in addition, surfaces with increased wettability optimized cell behavior resulting in increased viability, however, no statistical difference in cell adhesion between Jat and Mol groups for the osteoblastic lineage analyzed.

Keywords: Osseointegration, Dental Implants, Wettability, Titanium.

1. Introdução

Os implantes osteointegráveis são considerados como uma alternativa viável e previsível para a reabilitação de rebordos total ou parcialmente edêntulos (BRÅNEMARK et al., 2001; ADELL et al., 1981). A viabilidade bem como a previsibilidade desta técnica estão fortemente associadas com a osteointegração destes implantes. A osteointegração foi conceituada como o contato íntimo entre o tecido ósseo vital e a superfície do implante, sem interposição de tecidos moles na presença de carga funcional (SCHROEDER et al., 1981). Baseado neste conceito, a deposição óssea na superfície dos implantes é imprescindível para que índices de sucesso favoráveis sejam observados em reabilitações implantossuportadas (ADELL et al., 1981; BRYANT & ZARB 2002).

Os implantes dentários foram inicialmente desenvolvidos com superfície lisa, e utilizados por décadas seguindo um protocolo clássico onde se esperavam meses para osteointegração (ADELL et al. 1981). Com a evolução da Implantodontia, a busca pelo aumento da osseointegração direcionou pesquisadores a desenvolverem implantes com melhores características químicas, físicas e mecânicas, proporcionando, melhores resultados clínicos. Os implantes foram produzidos em diferentes formas para atender as necessidades biológicas e as características de superfícies também foram estudadas e reformuladas. Contudo, foi demonstrado que as características superficiais do titânio interferem no processo de osteointegração (PERRIN et al., 2002; BUSER et al., 2004; PALMQUIST et al., 2010).

Nos últimos 30 anos, diversos tratamentos de superfícies do titânio vem sendo estudado e desenvolvidos com o objetivo de determinar se o tempo de espera e o processo de osteointegração é otimizado em superfícies texturizadas em comparação com as superfícies originais lisas (COCHRAN et al., 2002; BUSER et al., 2004; GEHRKE et al.

2014). Várias técnicas tem sido desenvolvidas para produzir superfícies texturizadas, como métodos de adição e subtração de partículas com diferentes tipos e tamanhos para promover rugosidade modificando as características químicas das superfícies de implantes (BOWERS et al. 1992; BUSER et al. 2004; NOVAES et al. 2010; IEZZI 2012, GIL et al. 2014). Estudos demonstraram que modificações químicas, topográficas, alterações na carga de superfície e na molhabilidade podem acelerar o processo de reparo, aumentando a deposição óssea (PERRIN et al., 2002; ABRAHAMSSON et al., 2004; BUSER et al., 2004; RUPP et al., 2011; LAI et al., 2009; KLEIN et al., 2010; STANFORD, 2010; LANG et al., 2011, GIL et al. 2014).

Dentre estes tratamentos de superfície, o método mais utilizado é o jateamento da superfície seguido por um ataque ácido, visando aumentar a rugosidade da superfície. O jateamento com partículas específicas resulta em uma maior rugosidade, a qual é posteriormente atenuada pelo ataque ácido (RUPP et al., 2011; NOVAES et al., 2010). Estudos revelam que superfícies jateadas e submetidas ao ataque ácido apresentam maior contato a superfície do implante e o tecido ósseo (BIC) quando comparados à superfícies lisas (BUSER, et al., 1991; TRISI et al., 2003; CELETTI et al., 2006). Entretanto, superfícies jateadas, duplo ataque ácido e aumento da molhabilidade revelaram significativas melhorias na aposição óssea em momentos iniciais de osseointegração (PERRIN et al., 2002; BORNSTEIN et al., 2005).

Esta otimização no processo de osteointegração possivelmente se deve a modificações na superfície, uma vez que estudos *in vitro* demonstraram que o aumento na rugosidade de superfícies de titânio pode influenciar a proliferação e a diferenciação de osteoblastos (BOWERS et al., 1992; SCHWARTZ et al., 1999; MAMALIS & SILVESTROS 2011; OSATHANON et al., 2011; SINGH, 2012). Esta modificação

também parece aumentar a expressão de mediadores envolvidos na deposição óssea, tais como a fosfatase alcalina e a osteocalcina (KLEIN et al., 2010; PASSERI et al., 2010; CONSERVA & LANUTI & MENINI, 2010). Além da rugosidade, estudos demonstraram que outras modificações na superfícies como o aumento na molhabilidade interferem na absorção de proteína, a adesão celular e respostas celulares específicas (ZHAO et al., 2006; BOSSHARDT et al., 2011). Assim, o aumento na molhabilidade das superfícies de titânio dos implantes dentários vem ganhando atenção como um fator que pode influenciar a resposta biológica (RUPP et al., 2011). De fato, foi demonstrado que o aumento na molhabilidade resulta em maior deposição óssea e aumento na expressão de proteínas osteogênicas (KLEIN et al., 2010; BOSSHARDT et al., 2011).

Entretanto, alguns autores não observaram modificações no processo de osteointegração na presença de diferentes tipos de tratamentos de superfície (BRUNETTE, 1988; GEHRKE et al. 2014). Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o comportamento de osteoblastos na presença de superfícies de titânio lisas, submetidas ao jateamento seguido por ataque ácido e superfícies com aumento de molhabilidade.

2. Revisão de Literatura

Buser et al. (1988) realizaram um estudo de boca dividida em 9 *minipigs* a fim de comparar o contato entre osso e implante (BIC) em duas superfícies de implantes através da mensuração dos torques de remoção. Utilizaram implantes com superfície lisa seguida de ataque ácido (Osseotite), os quais foram comparados com implantes submetidos ao jateamento, seguido por ataque ácido (SLA). Os dentes anteriores da maxila foram inicialmente extraídos. Após 6 meses, foram instalados 6 a 8 implantes em cada animal, os quais foram avaliados após 4, 8 e 12 semanas da instalação. Os implantes foram submetidos ao teste de torque de remoção (RTV). Para os implantes com superfície lisa, seguida de ataque ácido (Osseotite), os valores de RTV foram de 62,5 Ncm, 87,6 Ncm e 95,7Ncm para os períodos 4, 8 e 12 semanas de reparo. Para os implantes submetidos ao jateamento, seguido por ataque ácido (SLA) os valores de RTV foram de 109,6 Ncm, 196,7 Ncm e 186,8 Ncm para os períodos 4, 8 e 12 semanas de reparo. Assim, os valores médio de RTV para implantes submetidos ao duplo tratamento foi de 75% a 125% maior do que para os implantes lisos seguido de ataque ácido em até 3 meses de reparo. Os autores concluíram que as modificações referentes à superfície dos implantes otimizam a deposição óssea.

Bowers et al. (1992) realizaram um estudo *in vitro* para analisar as respostas celulares de osteoblastos nos eventos de adesão e morfologia celular em diferentes topografias de superfícies de titânio através de perfilometria e microscopia eletrônica. Utilizados discos de titânio Cp com 1,25 mm diâmetro e 4 mm de espessura, os quais foram submetidos a diferentes tratamentos de superfície. As superfícies avaliadas apresentaram diferentes rugosidades, promovidas por um jateamento, seguido por ataque ácido por 1, 5 ou 10 minutos, caracterizando 3 grupos. Foram estabelecidos dois controles,

um de superfície irregular, obtido por meio de lixas com granulação de 60 a 120 grit, enquanto o grupo com superfície regular foi obtido por meio de lixas com granulação de 600 grit. Análises da rugosidade superficial por perfilometria revelaram que os discos pertencentes ao grupo com superfície irregular apresentam maiores valores de rugosidade 60 grit ($1,15\mu\text{m}$), jateadas ($0,87\mu\text{m}$), 120 grit ($0,47\mu\text{m}$), seguidos pelos grupos submetidos ao jateamento e ataque ácido 10 min ($0,28\mu\text{m}$), 5 min ($0,25\mu\text{m}$), 1 min ($0,14\mu\text{m}$), sendo que não foram detectadas diferenças significativas nos valores de rugosidade em relação à duração do ataque ácido. Já os discos com superfície regular apresentaram os menores valores de rugosidade 600 grif ($0,14\mu\text{m}$). Em seguida, foram realizados experimentos de cultura de osteoblastos nestas superfícies, os quais revelaram que superfícies de maior rugosidade apresentaram índices mais elevados de adesão celular. As superfícies submetidas ao jateamento e ataque ácido, apesar da menor rugosidade quando comparadas ao discos de superfície irregular 60 grit, apresentaram maior adesão celular. A morfologia das células foi semelhante em todas as superfícies, exceto na superfície irregular que apresentou células mais achatadas com o corpo mais próximo da superfície e extensões filopodial entre os interstícios. Assim, os autores concluíram que as superfícies irregulares com rugosidades produzidas por jateamento apresentam maior capacidade de adesão celular e proliferação do que em rugosidades produzidas por polimento, trituração e imersão em ácido.

Wennerberg et al. (1998) realizaram estudo para avaliar a deposição óssea em quatro tipos de modificações de superfícies de titânio. Foram utilizados 40 implantes, divididos em 4 grupos, sendo que cada implante apresentava duas superfícies. O grupo A foi submetido ao jateamento com partículas de Al_2O_3 (Óxido de Alumínio) com $25\mu\text{m}$ em um dos lados, o outro lado com superfície lisa. O grupo B foi submetido ao jateamento

com partículas de Al_2O_3 com 250 μm , o outro lado superfície lisa. O grupo C foi submetido ao jateamento com partículas de Al_2O_3 de 25 μm , enquanto o outro lado foi jateado com partículas de Al_2O_3 com 75 μm . O grupo D foi submetido ao jateamento com partículas de Al_2O_3 com 25 μm , enquanto o outro lado foi jateado com partículas de 250 μm . Os implantes foram instalados em 10 coelhos, os quais foram sacrificados após 12 semanas para avaliação histomorfométrica. Em relação a rugosidade superficial, foi observado que superfícies jateadas com partículas de 25, 75 e 250 μm apresentaram valores de rugosidade da ordem 1,22 μm , 1,43 μm e 2,20 μm , respectivamente. Além disso, detectou-se maior contato entre osso e implante nas superfícies jateadas, quando comparadas à superfícies lisas. As superfícies jateadas com partículas de 75 μm apresentaram aumento significativo no contato osso-implante em relação às superfícies jateadas com partículas de 25 μm . Não foram observadas diferenças no contato osso-implante entre as superfícies jateadas com partículas de 25 e 250 μm . Desta forma, os autores concluíram que a rugosidade superficial interfere na deposição óssea na superfície do implante.

Schwartz et al. (1999) realizaram uma revisão de literatura abordando o papel da rugosidade superficial no comportamento celular de uma linhagem osteogênica humana MG63. Estas células em resposta a rugosidade exibem uma morfologias dependente da superfície. As células MG63 são uma linha de células de osteossarcoma semelhante a osteoblastos humanos e respondem ao aumento da rugosidade da superfície com a diminuição da proliferação e aumento da diferenciação dos osteoblastos. A atividade de produção da fosfatase alcalina, osteocalcina, $\text{TGF-}\beta$ i e PGE_2 aumentam com a rugosidade. As prostaglandina medeiam os efeitos da rugosidade da superfície, uma vez que a indometacina impede o aumento da expressão de marcadores de diferenciação dessas

células. No presente contexto, isto sugere que a produção de prostaglandinas é modulada pela rugosidade da superfície, o que resulta em osteoblastos com maior grau de diferenciação.

Orsini et al. (2000) realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de avaliar as respostas celulares de células osteoblasto-like MG63 na presença de superfícies de titânio lisas e tratadas por meio de jateamento, seguido por ataque ácido. Análises por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por perfilometria revelaram que o tratamento de superfície resultou em alterações superficiais e aumento na rugosidade superficial, sendo de 0,75 μ m para superfícies lisas e 2,15 μ m para superfícies tratadas. Os experimentos de citotoxicidade demonstraram que ambas as superfícies são biocompatíveis. Entretanto, os resultados revelaram que superfícies lisas promovem uma adesão celular com perfil mais plano, enquanto as superfícies tratadas apresentam um perfil de maior irregularidade e com mais pseudópodos. Neste contexto, os autores sugerem que estas alterações morfológicas podem favorecer à adesão celular em superfícies tratadas por meio de jateamento, seguido de ataque ácido, otimizando o processo de osteointegração.

Mustafa et al. (2001) avaliaram os efeitos da rugosidade da superfície de titânio em relação à adesão, diferenciação e proliferação celular. As superfícies avaliadas foram: superfície lisa e superfícies jateadas com partículas de diferentes tamanhos, sendo de 63-90 μ m, 106-180 μ m e 180-300 μ m. A rugosidade média das superfícies foi de 0,2 μ m para superfícies lisas; 1,38 μ m para superfícies jateadas com partículas de 180-300 μ m. As superfícies jateadas com partículas intermediárias apresentaram valores de rugosidade superficial variando entre 0,72 e 1,3 μ m. Após 3 horas de cultura, não foram observadas diferenças entre as superfícies lisas e jateadas com partículas de 180-300 μ m. Todas as

superfícies submetidas ao jateamento apresentaram maior incorporação de timidina tritiada determinando uma fase do ciclo celular mais avançado, em relação às superfícies lisas, sendo que as superfícies jateadas com partículas de 180-300µm apresentaram os maiores valores. A expressão de osteocalcina também foi mais acentuada nas superfícies jateadas. Entretanto, não foram observadas diferenças entre as superfícies no que se refere à atividade da fosfatase alcalina. Desta forma, os autores concluíram que o aumento na rugosidade superficial favorece a proliferação e a diferenciação celular. Contudo, o aumento no tamanho das partículas jateadas 300µm comparada com a de 90µm, não influenciou na adesão celular.

Perin et al. (2002) avaliaram a influência da composição química na superfície de titânio submetida ao duplo tratamento SLA (Instituto Straumann AG Waldenburg, Suíça), na presença ou na ausência de hidreto de titânio. Três grupos de implantes foram instalados em mandíbulas de porcos e mantidos submersos por 10 semanas. O grupo controle SLA^{std} foi composto por implantes com superfície submetida ao duplo tratamento, na presença de hidreto de titânio. Os dois grupos testes apresentavam superfície com duplo tratamento SLA^{alt} (jateamento, duplo ataque ácido), fortemente alterada com ao nível da rosca com todos seus fios danificados com pinças de titânio e SLA^T (superfície jateadas, duplo ataque ácido) submetidas a tratamento térmico de 200° por 3 horas para remoção do hidreto de titânio. A análise histomorfométrica não revelou diferenças significativas entre os grupos, BIC (SLA^{std}: 82,12 + 6,1%), (SLA^{alt}: 86,25 + 7,4%) e sem hidreto titânio (SLA^T: 75,12 + 7,6%) os dados sugerem que as alterações da química da superfície SLA com e sem hidreto parecem não influenciar a deposição óssea na superfície do titânio, entretanto, as diferenças que ocorreram podem estar relacionadas com a combinação de macro e micro topografia. Assim sendo, os autores concluíram que as modificações químicas na

superfície do titânio não desempenharam papel significativo na resposta óssea, e que as propriedades osteofílicas estão relacionadas com a topografia.

Morra et al. (2003) analisaram a composição da superfície de titânio de 34 diferentes implantes dentários comercialmente disponíveis. Os implantes foram divididos de acordo com a superfície: lisa (grupo M) e submetidas ao jateamento (grupo S), ataque ácido (grupo A) e pulverização com plasma spray de titânio (grupo P). Os resultados revelaram uma associação entre a composição da superfície e sua topografia. Foi observado que a concentração de titânio nas superfícies com ataque ácido e pulverizadas com plasma foram maiores em relação às superfícies lisas. Contudo, a concentração de carbono foi maior nas superfícies lisas em relação às demais superfícies analisadas. Desta forma, os autores concluíram que a composição química da superfície está relacionada com sua topografia.

Buser et al. (2004) realizaram um estudo para avaliar a deposição óssea em implantes com superfície submetida ao duplo tratamento (jateamento e ataque ácido) em relação aos implantes com superfície submetida ao jateamento, ataque ácido e modificação química para aumento de molhabilidade. Inicialmente, procedeu-se a exodontia dos dentes anteriores da maxila de 6 *minipigs*. Após 6 meses, foram instalados de 3 a 4 implantes em cada animal, utilizando o modelo experimental de boca dividida. Os implantes foram mantidos por 2, 4 e 8 semanas, sendo posteriormente submetidos à análise histomorfométrica. Os resultados demonstraram aumento significativo no contato entre osso e implante (*BIC*) após 2 e 4 semanas nos implantes com superfície submetida ao aumento de molhabilidade. Detalhadamente, após 2 semanas a superfície com aumento de molhabilidade apresentou 49,3% de contato entre osso e implante, enquanto a superfície submetida ao jateamento e ataque ácido apresentou valores de 29,4%. Após 4 semanas, o

contato entre osso e implante foi de 81,9% para a superfície com aumento de molhabilidade, enquanto os valores foram de 66,5% para a superfície submetida somente ao duplo tratamento. Estas diferenças não foram detectadas após 8 semanas, sugerindo que o aumento na molhabilidade favorece a deposição óssea somente nos estágios iniciais do processo de osteointegração.

Masaki et al. (2005) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a expressão de genes Cbfa1 e RUNX-2 e fatores de crescimento relacionados com a osseointegração na presença de superfícies de titânio submetidas a diferentes tratamentos de superfície. As superfícies analisadas foram: superfícies submetidas ao jateamento com dióxido de titânio TioBlastTM (Astra Tech AB, Molndal, Suécia), superfícies submetidas ao jateamento, seguido pelo ataque ácido hidrofúorídrico, superfície OsseospeedTM (Astra Tech AB, Molndal, Suécia). Também foram avaliadas superfícies submetidas ao jateamento, seguido ataque ácido, superfície SLA-1 (Straumann AG, Waldenburg, Suíça) e superfícies submetidas ao jateamento, seguido ataque ácido e com aumento de molhabilidade, superfície SLA-2 (Straumann AG, Waldenburg, Suíça). Após 72 horas, as análises por microscopia de varredura revelaram osteoblastos mais achatados e com várias extensões citoplasmáticas em diversas direções na presença de discos com a superfície SLA-1 e SLA-2. Entretanto, os discos com as superfícies TioBlast e Osseospeed, as células apresentaram-se com morfologia mais achatada e poucos prolongamentos em relação às superfícies SLA-1 e SLA-2. Os experimentos realizados por PCR em tempo real revelaram aumento na expressão da fosfatase alcalina na presença da superfície SLA-2 quando comparado às demais superfícies. Contudo, a expressão de Cbfa1 e RUNX-2 foi aumentada nas superfícies Osseospeed e TioBlast, quando comparado às superfícies SLA-1 e SLA-2. Assim, os autores concluíram que as propriedades da superfície de implantes

podem contribuir na regulação da diferenciação celular dos osteoblastos, influenciando a expressão de genes e fatores de transcrição dos osteoblastos.

Sammons et al. (2005) compararam as interações entre osteoblastos provenientes da calvária de ratos e superfícies de titânio com diferentes características. Foram avaliadas superfícies lisas, superfícies anodizadas, superfícies submetidas ao plasma-spray de titânio e superfícies submetidas ao jateamento, seguido por ataque ácido. Para estas análises, duas metodologias foram empregadas. Inicialmente, as culturas de células sobre as superfícies foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura após 30 minutos de adesão celular. Além disso, os implantes foram inseridos em uma cultura, na qual osteoblastos oriundos da calvária de ratos foram cultivados por 2 e 4 semanas. Os resultados demonstraram que as superfícies submetidas ao jateamento, seguido por ataque ácido apresentaram taxas mais significativas de espalhamento celular em comparação com as outras. Na segunda semana, camadas multicelulares com matriz extracelular (ECM) estavam presentes em todas as superfícies. Na quarta semana, as camadas estavam consolidadas e tecido mineralizado estava associado com a matriz extracelular em superfícies jateadas e lisas. Concluíram que a propagação das células são mais rápidas nas superfícies rugosas, e que a diferenciação e a calcificação podem ocorrer tanto em superfícies microestrutura rugosas quanto em lisas.

Marinucci et al. (2006) investigaram os efeitos dos diferentes graus de rugosidade de superfície de titânio na resposta celular quanto à proliferação, diferenciação e morfologia celular. Foram utilizados discos de titânio com superfície lisa (n=30), superfície submetida ao jateamento com partículas de Al_2O_3 de 50 μm (micro-rugosidade) (n=30) e superfície submetida ao jateamento com partículas de Al_2O_3 de 350 μm (macro-rugosidade) (n=30). A rugosidade média da superfície submetida ao jateamento com

partículas de 50µm foi de 0,5µm, enquanto a superfície jateada com partículas de 350µm foi de 3µm. Nas superfícies usinadas as células apresentaram forma irregular, sendo mais planas e com maior espalhamento em relação às superfícies com micro e macro-rugosidade. Contudo, nas superfícies com micro-rugosidades, as células apresentaram-se bem aderidas a superfície, emitindo extensões citoplasmáticas. Nas superfícies com macro-rugosidade, as superfícies eram mais irregulares e possivelmente por esta razão, os osteoblastos não aderiram de forma homogênea com a superfície e formaram pontes citoplasmáticas de espessura variável. Já a proliferação celular foi significativamente maior em superfícies com macro-rugosidade. Nas superfícies submetidas ao jateamento, especialmente nas superfícies com macro-rugosidade, houve aumento na expressão de osteopontina, sialoproteína óssea e Runx2. Desta forma, os autores concluíram que superfícies com rugosidade de 3µm favorecem de forma mais efetiva a diferenciação *in vitro* de osteoblastos, em relação à superfícies lisas e com rugosidade de 0,5µm.

Zhao et al. (2006) avaliaram os efeitos de alterações na superfície em microescala e na escala submicron sobre morfologia, proliferação, diferenciação celular, produção de osteocalcina e atividade da fosfatase alcalina em células MG-63. Foram utilizados discos de titânio, os quais foram submetidos a tratamentos de superfície para obtenção de rugosidade em microescala e na escala submicron, sendo que superfícies lisas também foram avaliadas. As alterações em escala micrométrica foram produzidas por fotolitografia, enquanto as estruturas na escala submicron foram imersas em ataque ácido e anodização. Os valores de rugosidade média foram de 700 e 400nm para as superfícies submetidas ao ataque ácido e anodização, respectivamente. Já as superfícies submetidas a fotolitografia apresentaram rugosidade média de 60nm. Células MG-63 foram cultivadas na presença dos discos submetidos aos diferentes tratamentos de superfície. Estas células mostraram-se

mais sensíveis na presença de modificações na escala submicron. A morfologia celular foi semelhante nas superfícies lisas e anodizadas, enquanto a morfologia celular mostrou-se mais alongada em superfícies submetidas ao ataque ácido. A proliferação celular foi maior nas superfícies polidas, sendo seguidas por superfícies anodizadas. Os menores índices de proliferação foram detectados nas superfícies submetidas ao ataque ácido. A expressão de osteocalcina e prostaglandina E_2 apresentou valores maiores nas superfícies submetidas ao ataque ácido, reduzindo progressivamente nas superfícies anodizadas e lisas. A expressão de TGF- $\beta 1$ foi mais acentuada nas superfícies submetidas ao ataque ácido, seguido pelas anodizadas e pelas lisas. Assim sendo, estes resultados demonstram que modificações na escala submicron modulam o fenótipo dos osteoblastos e, possivelmente, interferem no processo de deposição óssea.

Bornstein et al. (2008) avaliaram a aposição óssea em superfícies submetidas ao jateamento, seguido por ataque ácido (superfície SLA) e superfícies submetidas ao jateamento, duplo ataque ácido e aumento na molhabilidade (superfície SLA modificada). Cinco cães foram selecionados, dos quais foram extraídos os pré-molares. Após 6 meses, seis implantes foram instalados em cada animal, sendo 3 de cada tipo de superfície, e mantidos sem carregamento. Após 2 e 4 semanas, os implantes foram submetidos à análise histológica. Após 2 semanas, houve um aumento significativo nos valores de contato entre osso e implante nas superfícies com aumento de molhabilidade de 28,2%, enquanto as superfícies submetidas ao jateamento, seguido por ataque ácido apresentaram valores médios de 22,2%. No entanto estas diferenças não foram detectadas após 4 semanas. Desta forma, os autores pontuaram que o aumento na molhabilidade da superfície é relevante somente nos estágios iniciais do processo de osteointegração.

Nishimoto et al. (2008) realizaram um estudo para comparar as propriedades das superfícies lisas e com rugosidade quanto a capacidades de adesão e espalhamento em experimentos de cultura celular com células osteoblasto-like MG-63. Foram avaliadas superfícies lisas, superfícies submetidas ao jateamento seguido por ataque ácido (SAE) e superfícies submetidas ao jateamento com partículas cerâmicas de fosfato de cálcio (RBM). Os valores de rugosidade média foram de $0,00\mu\text{m}$; $1,74\mu\text{m}$ e $1,53\mu\text{m}$ para superfícies lisas, superfícies submetidas ao jateamento seguido por ataque ácido e superfícies submetidas ao jateamento com partículas cerâmicas de fosfato de cálcio, respectivamente. Os valores de energia superficial foram de $34,3\text{dyn/cm}$; $25,3\text{dyn/cm}$ e $35,8\text{dyn/cm}$ para superfícies lisas, superfícies submetidas ao jateamento seguido por ataque ácido e superfícies submetidas ao jateamento com partículas cerâmicas de fosfato de cálcio, respectivamente. A adesão celular foi favorecida em superfícies rugosas comparadas as superfícies lisas. Entretanto, o espalhamento celular foi mais acentuado nas superfícies lisas em relação às superfícies de maior rugosidade.

Alves e Wassall (2009) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a biocompatibilidade de uma superfície de titânio lisa, a fim de analisar as respostas celulares de adesão, proliferação e morfologia celular de osteoblastos da linhagem Osteo-1. Foram utilizados implantes de titânio com superfície lisa (Neodent, Curitiba, Brasil), com 13 mm comprimento e 3,75 mm de diâmetro. As células foram cultivadas por 24, 48 e 72 horas, sendo posteriormente avaliadas em relação à adesão, proliferação e morfologia celular. No período de 24 horas de cultivo, as células apresentaram uma orientação anisotrópica, com afinidade as ranhuras dos implantes decorrentes do processo de usinagem. Após 48 horas, as células apresentaram adesão e morfologia achatada com prolongamentos citoplasmáticos curtos. Após 72 horas, observou-se uma proliferação de

células maiores e mais planas. Assim, os autores concluíram que a superfície lisa é biocompatível e permite a adesão e proliferação celular.

Lai et al. (2009) avaliaram a deposição óssea torno de implantes com superfícies submetidas ao jateamento, seguido por ataque ácido (superfície SLA) e superfícies submetidas ao jateamento, seguido por ataque ácido e aumento da molhabilidade (superfície SLA modificada). Foram selecionados 6 cães, os quais tiveram os pré-molares e molares removidos. Três meses após as exodontias, foram instalados 3 implantes de cada superfície nas hemimandíbulas esquerda e direita de cada animal, caracterizando um modelo de boca dividida. Em cada hemimaxila, foram criados 3 defeitos circunferenciais, um deles não apresentava gap, sendo que os demais apresentavam um gap de 0,5 mm e 1mm. A distância entre os implantes foi de 5mm. Após 2, 4 e 8 semanas, procedeu-se a análise histomorfométrica. Os resultados revelaram um padrão similar de deposição óssea para as duas superfícies. Em 2 e 4 semanas, a percentagem de osso em contato com implante (*BIC%*), preenchimento com osso novo (*NBF%*) e a distância entre a posição coronal do BIC e da parte inferior defeito (B-D) foram significativamente maiores para as superfícies com aumento na molhabilidade SLA mod *BIC%* (55,29 - defeito1; 41,21 - defeito 2); *NBF%* (78,77 – defeito 1, 70,93 – defeito 2); B-D (3- defeito 1, 2.5 - defeito 2). Após 8 semanas de cicatrização, esta diferença não foi significativa. No que se refere ao tamanho do defeito, não foram observadas diferenças significativas entre os dois tamanhos de defeitos. Os autores concluíram que a deposição óssea mais significativa foi detectada nas superfícies com aumento na molhabilidade nas fases iniciais do processo de osteointegração. Desta forma, sugere-se que o aumento na molhabilidade parece favorecer a deposição óssea em defeitos coronais circunferenciais em implantes não submersos.

Silva et al. (2009) avaliaram a proliferação e diferenciação de células derivadas da medula óssea humana sobre superfícies de titânio com diferentes rugosidades. Foram avaliadas as seguintes superfícies: superfícies lisas, superfícies submetidas ao ataque ácido com HF e HNO₃ por 15 e 30 minutos. Valores de rugosidade média, obtidos por perfilometria, foram de 0,15; 0,50 e 0,77µm para as superfícies lisas, superfícies submetidas ao ataque ácido por 15 minutos e superfícies submetidas ao ataque ácido por 30 minutos, respectivamente. Análises realizadas por meio de microscopia eletrônica de varredura revelaram um padrão de rugosidade mais uniforme para as superfícies submetidas ao ataque ácido por 15 minutos em relação às superfícies condicionadas por 30 minutos. Os discos de titânio submetidos ao ataque ácido apresentaram maior proliferação celular em relação aos discos com superfície lisa. Além disso, as superfícies submetidas ao ataque ácido apresentaram aumento na expressão de osteopontina e osteocalcina, o que indica um estágio mais avançado na diferenciação em osteoblastos. Comparando os grupos submetidos ao ataque ácido, resultados mais favoráveis foram obtidos com a rugosidade de 0,5m, obtida com o ataque ácido por 15 minutos.

Togashi et al. (2009) avaliaram a influência da rugosidade e do aumento de molhabilidade de superfícies de titânio na viabilidade, proliferação e diferenciação de osteoblastos em um meio suplementado por recombinante humano da proteína morfogenética humana-7 (rhBMP-7). Foram avaliadas as seguintes superfícies: superfície lisa, superfície submetida ao jateamento, seguido por ataque ácido (SLA) e superfície submetida ao jateamento, seguido por ataque ácido e aumento de molhabilidade (SLA modificado). Osteoblastos da linhagem Osteo-1 foram cultivados nas diferentes superfícies na presença e na ausência de rhBMP-7. A adição de rhBMP-7 não influenciou na viabilidade e proliferação celular, na síntese de colágeno e na formação de matriz mineralizada. Da mesma forma, não foram detectadas diferenças na viabilidade e

proliferação celular, na síntese de colágeno e na formação de matriz mineralizada nas diferentes superfícies analisadas. Assim, os autores concluíram que a suplementação do meio de cultura com rhBMP-7 não influenciou na viabilidade, proliferação e diferenciação de osteoblastos. E ainda, todas as superfícies analisadas permitiram a completa expressão do fenótipo dos osteoblastos.

Calvo-Guirado et al. (2010) realizaram um estudo experimental na mandíbula de cães, comparando a reabsorção óssea da crista e aposição óssea sobre superfícies de implantes com superfícies condicionadas e não condicionadas (superfícies lisas). O condicionamento da superfície foi baseado no jateamento, ataque ácido e com íons hidróxido, com o intuito de aumentar a energia superficial. Inicialmente, foram extraídos bilateralmente os terceiros e quartos pré-molares bem como a raiz distal dos primeiros molares dos cães. No mesmo momento cirúrgico, cada lado da mandíbula recebeu três implantes, sendo que a lateral direita do implante apresentava superfície condicionada (CS) e a lateral esquerda apresentava superfície não-condicionada (NCS). Após 2, 4, 12 semanas, as amostras foram submetidas à análise histológica. Não foram observadas diferenças histológicas no tecido ósseo depositado em ambas as superfícies. Entretanto, superfícies condicionadas apresentaram melhores resultados referentes às médias de reabsorção óssea, sendo de 1,21mm, enquanto as superfícies não condicionadas apresentaram valores médios de 2,28mm. Em relação ao contato entre osso e implante, valores médios de 44,6% foram observados nas superfícies condicionadas, enquanto nas superfícies não condicionadas os valores foram de 36,6%. Desta forma, os autores concluíram que superfícies condicionadas apresentaram um aumento de cerca de 8% na deposição óssea em relação às superfícies não condicionadas. E ainda, o condicionamento da superfície foi relacionado com redução na reabsorção óssea alveolar.

Carneiro-Campos et al. (2010) avaliaram os efeitos de duas superfícies de titânio sobre a adesão de células indiferenciadas. Foram avaliadas superfícies lisas e superfícies submetidas ao jateamento, seguido por ataque ácido. Utilizaram células estromas da medula óssea. Após a análise por microscopia eletrônica de varredura e mensuração do ângulo de contato, foram detectadas diferenças topográficas nas superfícies. Além disso, as superfícies tratadas apresentaram aumento na molhabilidade em relação às superfícies lisas. Não foram verificadas alterações na composição química entre as superfícies analisadas. E ainda, o tratamento de superfície não resultou em diferenças significativas na adesão de células estromais da medula óssea após 18 horas em cultura. Desta forma, os autores concluíram que o tratamento de superfície promove alterações topográficas e a morfológicas das células são influenciadas pela topografia. Contudo, estas diferenças não influenciaram a adesão celular após 18 horas.

Conserva et al. (2010) realizaram um estudo *in vitro* para comparar a adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos (SaOS-2) e células mesenquimais indiferenciadas na presença de superfícies de titânio submetidas a diferentes tratamentos. Foram avaliadas superfícies submetidas somente ao jateamento (grupo SB) (n=39) e superfícies submetidas ao jateamento e ataque ácido em temperaturas elevadas (grupo GBAE) (n=39). O grupo GBAE apresentou menor percentual de contaminantes e alto percentual de titânio quando comparado ao grupo SB. Ambas as superfícies apresentaram valores similares de rugosidade média (Ra), enquanto a profundidade dos vales (Rz) e a densidade da porosidade (RSm) foi significativamente maior nas superfícies do grupo GBAE. A superfície GBAE apresentou maior proliferação celular em relação ao grupo SB. Não foram observadas diferenças significativas na atividade de fosfatase alcalina entre os grupos para ambas as linhagens celulares analisadas. Desta forma, os autores concluíram

que a superfície GBAE apresentou menor percentual de contaminantes e maior percentual de titânio. Em relação à influência da topografia e composição química da superfície, houve aumento na adesão e proliferação nas superfícies do grupo GBAE.

Klein et al. (2010) avaliaram a influência de modificações na superfície do titânio sobre a proliferação de células osteogênicas e expressão de marcadores osteogênicos. Foram avaliadas as seguintes superfícies: superfícies lisas, superfícies submetidas ao jateamento, seguido por ataque ácido (SLA) e superfícies submetidas ao jateamento, seguido por ataque ácido com aumento de molhabilidade (SLA modificada). Células osteogênicas humanas foram cultivadas na presença das diferentes superfícies, sendo que as superfícies tratadas (SLA e SLA modificada) apresentaram melhores resultados referentes diferenciação celular. A superfície SLA modificada revelou menores índices de proliferação. Porém, apresentou valores mais significativos na expressão de mediadores osteogênicos como a osteocalcina. Assim, os autores concluíram que a topografia bem como o aumento na molhabilidade interferem no processo de deposição óssea na superfície dos implantes.

Novaes et al. (2010) revisaram a literatura sobre superfícies de implante analisando o comportamento *in vivo* e *in vitro* quanto à osteointegração. O estudo abordou resultados com micro e nano topografias, avaliando a interface osso-implante. Além disso, discutiu também as perspectivas da incorporação de substâncias biominéticas (como peptídeos e proteínas morfogenéticas) à superfície dos implantes e seus efeitos na modulação da neoformação óssea. Esta avaliação envolveu tratamento das superfícies com jateamento de partículas cerâmica, plasma spray de titânio, ataque ácido e anodização. Os resultados mostraram que estas alterações em escala de micro e nano topografias na superfície dos implantes associado a biofuncionalização apresentam benefícios na interação da superfície

com as células ósseas, otimizando o processo de osteointegração. Os autores sugerem que o processo de biofuncionalização seja o próximo passo no desenvolvimento de implantes osseointegráveis.

Passeri et al. (2010) analisaram a morfologia e a diferenciação de osteoblastos humanos provenientes de fragmentos ósseos sobre diferentes superfícies de titânio. Foram avaliadas as seguintes superfícies: superfície lisa polida (T1), superfície lisa sem polimento (T2), superfície submetida ao jateamento e ataque ácido (T3), superfície submetida ao jateamento e ataque ácido, modificada com peróxido de hidrogênio (T4) e superfície modificada com plasma-spray de titânio (T5). Os valores de rugosidade média foram de 0,22; 0,40; 0,58; 0,52 e 4,9 μ m para os grupos T1, T2, T3, T4 e T5, respectivamente. A morfologia das células foi avaliada após 6, 24 e 72 horas, 7 e 14 dias por microscopia eletrônica de varredura. Esta análise revelou que a topografia interfere no formato e na adesão das células. As células apresentaram melhor espalhamento nas superfícies lisas (grupos T1 e T2), sendo que as projeções citoplasmáticas mostraram-se mais discretas nos grupos T3 e T4. Além disso, as células apresentaram focos de adesão mais pronunciados bem como índices mais elevados de proliferação celular nos grupos T3, T4 e T5. Após 7 dias, a produção de osteocalcina foi maior no grupo T4, sendo que, após 14 e 21 dias, não houve diferenças entre os grupos. A produção de osteoprotegerina aumentou progressivamente ao longo do tempo, contudo não variou significativamente entre os grupos. Desta forma, os autores concluíram que todas as superfícies permitem a adesão e proliferação celular. Porém, as superfícies dos grupos T4 e T5 apresentam resultados mais favoráveis no que se refere a adesão, proliferação e diferenciação de células da linhagem osteoblástica.

Bosshardt et al. (2011) avaliaram morfológicamente e morfometricamente o processo de osteointegração em implantes com superfície submetida ao jateamento e ataque ácido (SLA, Straumann) e superfícies submetidas ao jateamento, ataque ácido e modificação química para aumento de molhabilidade (SLActive, Straumann). Além disso, a influência de pequenos fragmentos ósseos, provenientes da instalação dos implantes, foi verificada. Quarenta e nove implantes foram instalados na região retromolar de 28 pacientes. Todos os implantes foram recobertos com debris ósseos. Após 7, 14, 28 e 42 dias, os implantes foram removidos com uma trefina e submetidos à análise histológica. A formação de tecido ósseo neoformado foi detectada em todos os implantes após 7 dias. Observou-se um aumento gradual na quantidade de tecido ósseo neoformado, enquanto a quantidade de tecido ósseo maduro, tecidos moles e debris ósseos foram reduzindo progressivamente ao longo do tempo. Após 2 e 4 semanas, houve uma tendência a aumento na quantidade de tecido ósseo neoformado nas superfícies com aumento de molhabilidade. Considerando os períodos de 7 e 42 dias, a proporção entre debris ósseos e tecidos moles foi de 50/50 para 10/90 nas superfícies com aumento de molhabilidade, enquanto foi de 38/62 para 10/90 nas superfícies submetidas ao jateamento e ataque ácido. Desta forma, os autores concluíram que ambas as superfícies permitem a deposição óssea. A redução na proporção entre debris ósseos e tecidos moles sugere que os debris contribuem para o início da deposição óssea.

Ivanovski et al. (2011) analisaram o perfil de expressão gênica durante os eventos iniciais do processo de osteointegração em um modelo humano. Nove pacientes receberam 9 implantes de titânio na região retromolar. Estes implantes foram submetidos ao jateamento, seguido por ataque ácido e modificação química para aumento de molhabilidade. Após 4, 7 e 14 dias, os implantes foram removidos com uma trefina e o

tecido adjacente aos implantes foi avaliado por análise de *microarray*. Após 4 dias, o perfil de expressão gênica foi associado com o processo inflamatório e de proliferação celular. Após 7 e 14 dias, a expressão foi relacionada aos genes referentes ao processo de ossificação e angiogênese. No que se refere a transdução do sinal, a cascata NF-B e IB quinase foi predominante após 4 dias, enquanto as vias de sinalização TGF-beta/BMP, Wnt e Notch foram associadas aos períodos seguintes. Assim, os autores concluíram que a expressão gênica nos estágios iniciais mostrou-se relacionada ao processo inflamatório e de proliferação, enquanto os períodos seguintes foram relacionados aos processos de osteogênese e angiogênese. Estas modificações referentes ao processo inflamatório e de proliferação parecem ser reguladas pela cascata NF-B e IB quinase, enquanto os processos de osteogênese e angiogênese parecem ser regulados pelas vias de sinalização TGF-beta/BMP, Wnt e Notch.

Klinger et al. (2011) examinaram se os processos industriais de fabricação podem interferir no crescimento e diferenciação de células osteossarcoma humano (Saos-2) em superfícies de implante. Foram avaliados discos de titânio com superfície usinada e rugosa. Células Saos-2 foram cultivados sobre os discos. Ensaio XTT foi utilizado para avaliar o crescimento celular e a diferenciação foi avaliada pela atividade da fosfatase alcalina e secreção da osteocalcina. Foram examinados rugosidade, envelhecimento do ácido, modificação da superfície pelo flúor e três materiais de embalagem. Os resultados mostraram que as células proliferam mais em superfícies usinadas e apresentam um fenótipo mais diferenciado em superfícies rugosas. Imersão dos discos em até 200 ciclos em ácido promoveu diminuição da proliferação e aumento da diferenciação, sugerindo que a atividade biológica da superfície do implante não foi alterada utilizando o mesmo ácido, mesmo para até 2.000 ciclos. A modificação da superfície com flúor aumentou atividade

da fosfatase alcalina. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os três materiais de embalagem sobre o crescimento celular, atividade de ALP e secreção osteocalcina. A atividade da ALP foi maior na superfície modificada com flúor em comparação a não modificada. Os autores concluíram que os processos de fabricação podem afetar o comportamento celular em superfícies de implantes. No entanto, a rugosidade, envelhecimento ácido e a superfície modificada pelo flúor podem melhorar os níveis regulação de marcadores de diferenciação celular em Saos-2.

Mamalis e Silvestros (2011) realizaram um estudo para avaliar o comportamento de células mesenquimais provenientes da medula óssea no que se refere a adesão, proliferação e expressão de fatores osteogênicos. Foram avaliadas as seguintes superfícies: superfícies lisas, superfícies submetidas ao jateamento e ataque ácido (SLA, Straumann) e superfícies submetidas ao jateamento e ataque ácido com aumento de molhabilidade (SLActive, Straumann). A adesão e proliferação celular foi avaliada após 3 e 24 horas. Após 24 horas, a expressão de fatores osteogênicos foi realizada. Em relação à adesão celular, as superfícies lisas mostraram um discreto aumento, sendo que não foram detectadas diferenças entre as superfícies tratadas. A proliferação celular também foi mais acentuada nas superfícies lisas comparado às superfícies tratadas. Quando as superfícies tratadas foram comparadas, houve redução significativa nas superfícies com aumento de molhabilidade em relação às superfícies submetidas ao jateamento e ataque ácido. No que se refere a expressão gênica de fatores osteogênicos, 19 genes apresentaram aumento na expressão nas superfícies submetidas ao jateamento e ataque ácido, enquanto 27 genes apresentaram esta aumento nas superfícies com aumento de molhabilidade. Com bases nestes dados, os autores concluíram que o aumento na molhabilidade resulta em redução

na adesão e proliferação celular, associado ao aumento na expressão de fatores osteogênicos.

Osathanon et al. (2011) examinaram os eventos celulares iniciais de células osteoblasto-like (SaOS-2) na presença de superfícies de titânio com diferentes rugosidades, sendo de 0,003; 0,09 e 0,24 μ m. Não foram observadas diferenças significativas na adesão celular entre as superfícies analisadas. Entretanto, o espalhamento e a proliferação das células foi mais pronunciado nas superfícies de maior rugosidade (0,09 e 0,24 μ m). Estes dados indicam que o aumento na rugosidade favorece o espalhamento e a proliferação celular, favorecendo o processo de deposição óssea.

Singh (2012) realizou um estudo *in vitro* visando analisar os tratamentos de superfícies, influência dos tratamentos de superfície e da rugosidade superficial sobre o comportamento de osteoblastos da linhagem HOS (derivados de osteosarcoma humano) em ensaios de cultura celular. Superfícies lisas e submetidas ao jateamento e ataque ácido foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura e perfilometria. Estas análises revelaram que as superfícies submetidas ao jateamento e ataque ácido apresentaram valores mais elevados de rugosidade para as superfícies tratadas ($R_a=1,55\mu$ m), enquanto as superfícies lisas apresentaram rugosidade média de 0,9 μ m. Os experimentos de microscopia revelaram maior espalhamento das células nas superfícies submetidas ao jateamento e ataque ácido em relação às superfícies lisas. Desta forma, os autores concluíram que o aumento na rugosidade superficial por meio de jateamento e ataque ácido otimiza a adesão celular uniformemente, favorecendo o processo de osteointegração.

Rupp et al. (2014) realizaram uma revisão avaliando o comportamento da molhabilidade de superfícies de implantes dentários nos aspectos físicos-químicos. Iniciaram com uma abordagem dos aspectos básicos que envolvem a medição da

molhabilidade, bem como, os aspectos clínicos da análise do ângulo de contato. Descreveram sobre o papel fundamental da influência da energia de superfície sobre o comportamento da molhabilidade. Finalizaram, descrevendo como a molhabilidade é influenciada pela rugosidade da superfície.

Chen et al. (2014) realizaram uma análise *in vitro* para avaliar o comportamento celular na proliferação, atividade da ALP, mineralização e expressão gênica em cinco diferentes tratamentos de superfícies. Células mesenquimais de medula óssea foram cultivadas em discos com superfícies maquinadas (m), superfícies com modificação eletroquímica (ECH), jateamento e ataque ácido (SLA), jateamento e tratamento com peróxido de hidrogênio, e aquecimento (SAOH) e jateamento e aquecimento alcalino (SMART). Após 1, 4, 7 e 14 dias as células foram analisadas. A superfície mais hidrofílica foi (SAOH) enquanto que, a superfície mais hidrofóbica foi a SLA. As superfícies com maior rugosidade foi SLA e SMART, enquanto que SAOH apresentaram rugosidade moderada, entretanto, ambas apresentaram maiores índices de proliferação até 7 dias de cultura. A atividade da ALP e a expressão da OCN foi significativamente maior nas superfícies ECH e SMART após 10 dias em comparação aos outros grupos. SLA, SAOH e SMART apresentaram maiores índices de rugosidades e melhores respostas iniciais na adesão, proliferação e expressão morfológica após 1 dia de cultura. Os autores concluíram que células mesenquimais de medula óssea cultivadas em discos com superfícies ECH e SMART apresentaram maior capacidade de mineralização *in vitro*.

Yeo (2014) realizou uma revisão de literatura com estudos sobre superfícies modificadas por diferentes técnicas em estudos *in vitro*, *in vivo* e histomorfométrico. Os métodos analisados que proporciona modificar a superfície dos implantes incluíram tratamentos com jateamento de partículas, o ataque ácido, oxidação anódica, incorporação

de flúor e adição de fosfato de cálcio. Estudos que demonstraram superfícies com aumento da molhabilidade (SLActive) apresentaram respostas iniciais mais rápidas comparadas com (SLA) e outras superfícies modificadas. Em estudos *in vitro*, as superfícies modificadas apresentaram maior adesão celular e a expressão de genes marcadores osteogênicos, bem como, a presença das sialoproteínas ósseas. Os estudos histomorfométricos mostraram respostas semelhantes em animais utilizando superfícies SLA e anodizadas. O autor apontou as propriedades físicas como rugosidade seguida de ataque ácido e a modificação das propriedades químicas através incorporação de tratamento com flúor e fosfato de cálcio como a principal característica para as respostas biológicas favoráveis.

Gehrke et al. (2014) realizaram um estudo *in vitro* e *in vivo* e a fim de avaliar e comparar se há existência de relação entre a energia de superfície, molhabilidade e comportamento clínico de implantes com diferentes tratamentos de superfície. Utilizaram neste estudo, superfícies tratadas por jateamento com micropartículas de óxido de titânio, seguida de ataque ácido (grupo experimental/EG) e superfície usinada (grupo controle/GC). Nos experimentos *in vitro*, 15 discos de titânio de cada grupo foram avaliados por MEV e EDS analisando a rugosidade e a molhabilidade. Para os testes *in vivo*, 12 implantes de cada grupo foram instalados na tíbia de 6 coelhos e removidos após período de 30 e 60 dias para avaliação histológica. As superfícies apresentaram Ra 0,15 e Ra 0,69 μm nos grupos CG e EG respectivamente. Os resultados por EDS mostraram que os implantes com a superfície CG apresentaram maiores índices de molhabilidade (27%) após 30 seg, no grupo EG o ângulo de contato se manteve durante todo o tempo analisado. A formação de óssea *in vivo*, foi mais evidente no grupo EG. Os autores sugerem que a molhabilidade foi inversamente proporcional à quantidade e qualidade de formação óssea. Concluíram que ambas os testes *in vitro* e *in vivo* demonstraram um excelente resultados

para resposta biológica das superfícies tratadas com jateamento, seguido por ataque ácido, no entanto, estes resultados foram atribuídos as características da superfície topográfica e não à molhabilidade.

Gil et al. (2014) realizaram um estudo em mini-pigs para avaliar a capacidade de formação óssea inicial em novo sistema de tratamento de superfície em 2 passos e comparar com diferentes tratamentos de superfícies. Vinte mini-pigs receberam 324 implantes, ou seja, 80 de cada superfície sendo: superfícies Bio-ativadas produzidas por jateamento, e tratamento termoquímico (*2Step*), micro-rugosidade produzido por jateamento de partículas (*GBlast*), micro-rugosidade produzido por ataque ácido (*AEtch*) e usinados (*Ctr*). Análise histomorfométrica foi realizado após período 3 dias, 1, 2, 3 e 10 semanas para avaliar o percentual de contato osso-implante. A composição da superfície, bem como a topografia e molhabilidade foram analisados. A rugosidade nos grupos foi de (*Ctr*) 0,21; (*AEtch*) 1,59; (*GBlast*) 3,64 e (*2Step*) 3,20 μ m. Os resultados mostraram maior rugosidade e molhabilidade na superfície *2Step*. A osseointegração entre as superfícies *2Step* e *GBlast* nos tempos 1, 2, 3 apresentaram diferenças estatisticamente significativas. No entanto, não foram detectadas diferenças significativas neste estudo. O índice de formação óssea na semana 2 na superfície *2Step* foi mantido até o final do experimento, sem qualquer alteração significativa (85%). As superfícies *2Step* e *GBlast* apresentaram maiores índices de osseointegração em todos os tempos analisados. Concluíram que superfícies com tratamento de 2 passos (jateamento, seguido de tratamento termoquímico) pode acelerar significativamente o tempo de osseointegração em comparação as outras superfícies analisadas.

3. Proposição

3.1 Objetivos gerais

O objetivo deste estudo *in vitro* foi analisar, por meio de culturas de células, o comportamento de osteoblastos de linhagem ROS 17/2.8 de ratos na presença de discos de titânio com diferentes tratamentos de superfícies.

3.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar os discos analisados quanto à rugosidade e molhabilidade nos diferentes grupos: superfície lisa (L), superfície jateada com ataque ácido (Jat) e superfície jateada com ataque ácido submetida ao aumento da molhabilidade (Mol).

2. Avaliar a viabilidade e adesão celular em culturas de osteoblastos na presença de discos de titânio com superfície lisa, superfícies submetidas ao jateamento seguido por duplo ataque ácido e superfícies com aumento na molhabilidade.

3. Avaliar a atividade de fosfatase alcalina em culturas de osteoblastos na presença de discos de titânio com superfície lisa, superfícies submetidas ao jateamento seguido por duplo ataque ácido e superfícies com aumento na molhabilidade.

4. Materiais e Métodos

4.1 Superfícies analisadas:

Foram avaliados discos de titânio comercialmente puro grau IV com 6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura submetidos a diferentes tratamentos de superfície, sendo: superfícies lisas (grupo L), superfícies submetidas ao jateamento seguido por ataque ácido (grupo Jat) (superfície Neoporos[®], Neodent, Curitiba, Brasil), e grupo Mol, composto por discos com superfícies submetidas ao jateamento seguido por ataque ácido com aumento da molhabilidade (superfície Acqua[®], Neodent, Curitiba, Brasil).

Os discos de titânio foram produzidos e esterilizados por radiação gama (Neodent[®], Curitiba, Brasil), após foram armazenados dentro das embalagens em um ambiente seco e protegido da luz.

4.2 Caracterização das superfícies:

As superfícies analisadas foram caracterizadas por meio de análise da topografia e da molhabilidade. A topografia de superfície dos discos de titânio foi avaliada utilizando Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) de alta resolução [Field Emission Scanning Electron Microscope (FEG-SEM), Hitachi S-4700, Tóquio, Japão]. A avaliação de rugosidade foi padronizada em cada amostra (Figura 1), o disco foi produzido em formato circular dividido em quatro quadrantes e foram avaliados 3 discos de cada grupo. A composição química das superfícies foi avaliada através de EDS (espectroscopia de energia dispersa) acoplado ao Microscópio Eletrônico de Varredura. A rugosidade da

superfície foi avaliada utilizando microscópio confocal (Nanofocus Digital Instruments, Oberhausen, Alemanha), por meio do aumento de 20 vezes.

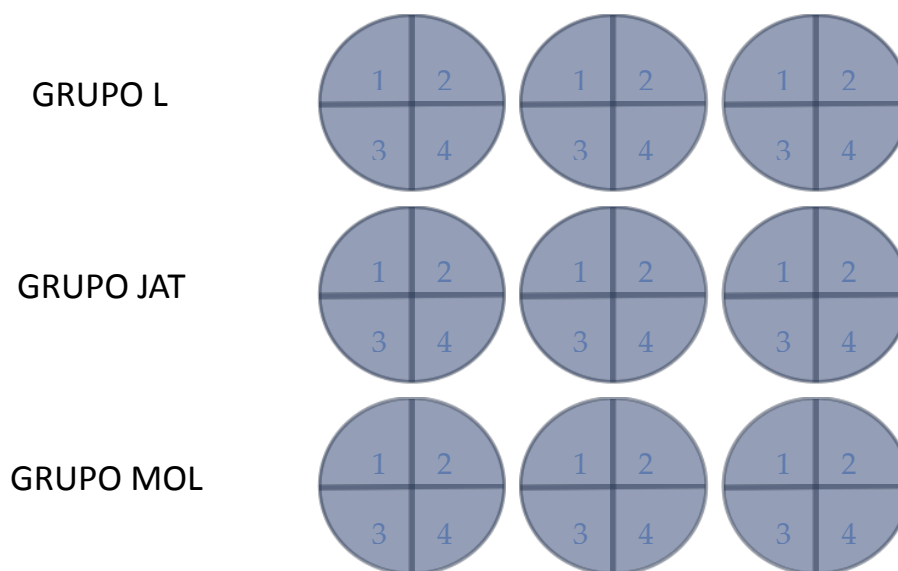


Figura 1 - Representação esquemática ilustrando as regiões dos discos submetidas à caracterização.

A molhabilidade da superfície foi avaliada através da mensuração do ângulo de contato de uma gota (0,5mL) de água deionizada através do goniômetro (DSA10, Kruss, Hamburg, Alemanha), dispositivo medidor automático de ângulo de contato (Park et al., 2010) .

4.3 Cultura de células de osteoblásticas:

A linhagem celular utilizada neste estudo foi a linhagem de osteoblastos ROS 17/2.8 de ratos, previamente obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA). As células foram mantidas em

nitrogênio líquido (criopreservação) em solução de congelamento composta por meio *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF). Para a realização dos ensaios, as células foram descongeladas à temperatura ambiente e expandidas em dois frascos (garrafas) de cultura celular de 25cm² (Corning Glass Workers, New York, EUA) em meio DMEM completo (Figura 2) em estufa incubadora umidificada na temperatura de 37°C contendo 95% de oxigênio e 5% de CO₂ (Figura 3). A proliferação destas células foi monitorada com o uso de microscópio invertido Olympus IX51 (Olympus Optical, Tóquio, Japão) (Figura 4).

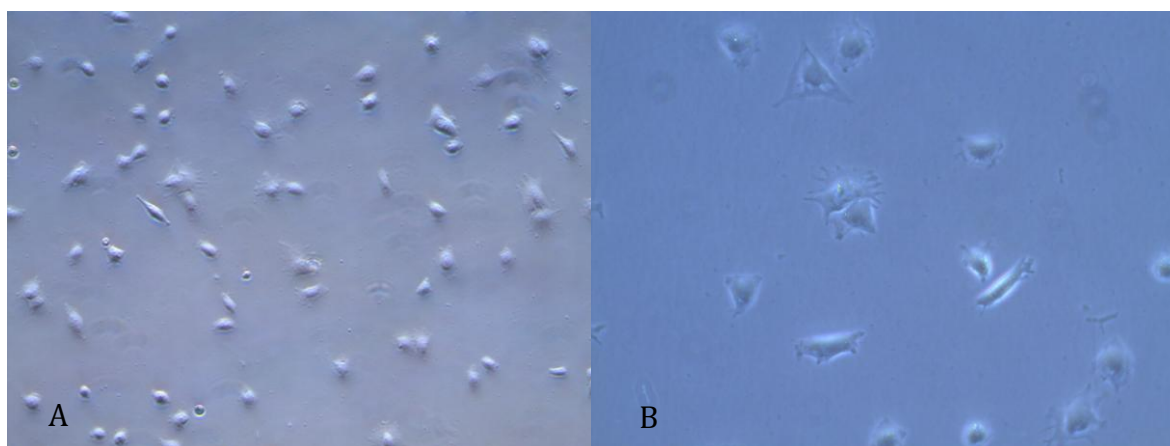


Figura 2 - Proliferação de células da linhagem osteoblástica nos frascos de cultura previamente ao plaqueamento. (A) aumento de 10 vezes e (B) aumento de 40 vezes.



Figura 3 - Estufa incubadora com frascos e placas de cultura celular.

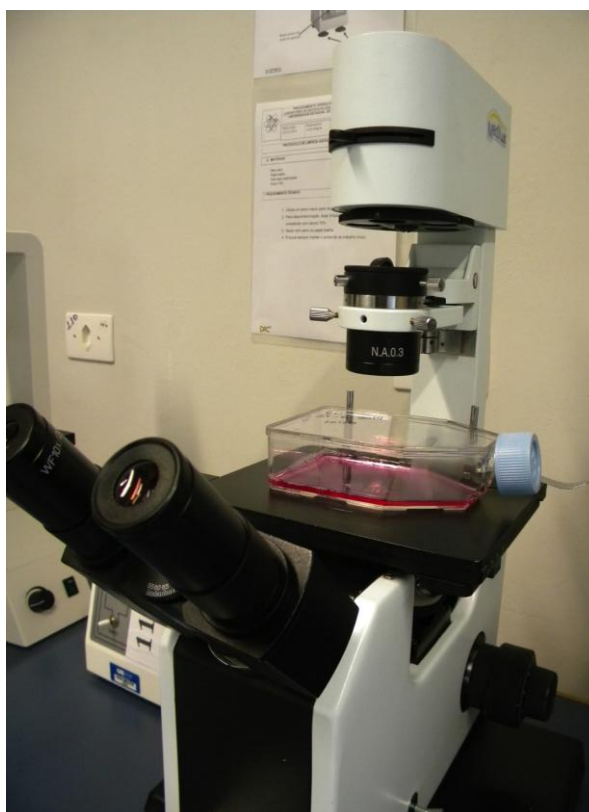


Figura 4 - Microscópio óptico invertido para monitoramento da cultura celular.

Após a formação da monocamada de células, ou seja, após as mesmas atingirem confluência, o meio DMEM-s (suplementado) das garrafas foi descartado com o auxílio de uma pipeta sorológica, sendo os frascos lavados com 10 mL de solução de salina tamponada com fosfato (PBS), a fim de evitar que células mortas fossem plaqueadas. Após a aspiração do PBS, foram adicionados 3 mL de solução de tripsina 0,05% + EDTA 0,02% e os frascos foram mantidos por 3 minutos na estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 3 minutos com o objetivo de desaderir as células. Em seguida, foi adicionado em cada frasco e 3 mL de DMEM-s.

O meio de cultura contendo as células desaderidas pela tripsina foi removido e pipetado em dois tubos do tipo Falcon esterilizados com capacidade de 10 mL. Os frascos foram centrifugados a 1200 rpm durante 10 minutos para separação das células do meio, resultando na formação de um *pellet* de células no fundo do tubo (Figura 5). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 10 mL de meio DMEM foi adicionado no tubos contendo as células.



Figura 5 - Procedimento de centrifugação para obtenção do *pellet* de células.

A contagem global de células foi efetuada na câmara de Neubauer, partindo-se da suspensão de células obtida. Foram utilizados 10 mL desta solução, na qual foi adicionado 10 mL da solução de Azul de Trypan a 1% para avaliação da viabilidade celular e para a contagem total do número de osteoblastos (Figura 6). A contagem foi realizada nas duas câmaras de um hemocitômetro, sendo que cada câmara recebeu 10 mL desta nova suspensão de células com a solução de Azul de Trypan. A contagem das células foi realizada em microscópio de fase invertido. As células viáveis foram caracterizadas pela ausência da marcação com o Azul de Trypan, sendo que células não viáveis mostraram-se marcadas em azul. O número total de células viáveis originárias do frasco foi obtido através da seguinte equação matemática: Número total de células viáveis contadas x diluição no azul de Tripan x 10^4 / Número de quadrados do hemocitômetro usados para contagem. Com base na concentração de células, procedeu-se a diluição visando obter uma concentração de $1,0 \times 10^3$ células/mL em DMEM + 1% de SFB. Esta solução de células foi colocada em placas de cultura de 96 poços, nos quais os discos de titânio foram previamente inseridos. A placa foi mantida por 7 e 14 dias a 37°C, com 95% de oxigênio e 5% de CO₂ com troca do meio a cada 48 horas.

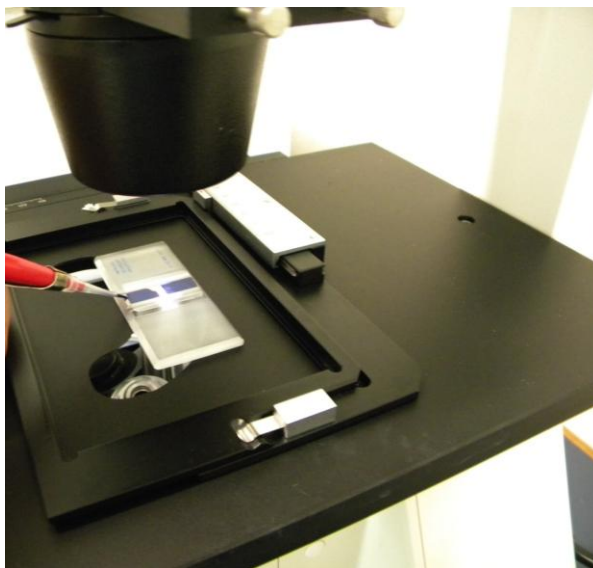


Figura 6 - Avaliação quantitativa das células com uso de hemocitômetro (câmara de Neubauer).

Viabilidade Celular – Método MTT:

A viabilidade celular da linhagem ROS 17/2.8 de osteoblastos foi avaliada nos diferentes grupos pelo ensaio colorimétrico MTT (Sigma Aldridge, São Paulo, Brasil) após 7 e 14 dias do plaqueamento das células conforme descrito por (Mosmann, 1983). Foram preparadas alíquotas de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) a 5 mg/mL, as quais foram adicionadas em cada poço do meio de cultura por 3 horas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de oxigênio. Após esse período, o sobrenadante de cada poço foi retirado, sendo substituído por 200 µL de etanol absoluto e mantido a temperatura ambiente até a completa solubilização do precipitado formado para medida colorimétrica em espectrofotômetro (570nm; µQuanti, Bio-tek Instruments, Inc). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem e comparada a grupo controle. O grupo controle deste experimento foi realizado em poços contendo somente

células, ou seja, na ausência de discos de titânio. Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

Adesão Celular – Método MTT:

A adesão celular da linhagem ROS 17/2.8 de osteoblastos foi avaliada nos diferentes grupos pelo ensaio colorimétrico MTT (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil), após 7 e 14 dias do plaqueamento das células (Mosmann, 1983). Porém, para a análise de adesão celular, os discos foram removidos dos poços e transferidos para um novo poço em outra placa de 96 poços. Esta transferência foi realizada para assegurar que a contagem de células aderidas não incluísse as células aderidas à parede dos poços. Assim sendo, foram contadas somente as células aderidas aos discos de titânio. A adesão celular foi expressa em porcentagem e comparada a grupo controle em que foi utilizada apenas as células sem a presença das amostras de titânio. Os experimentos foram realizados em quintuplicata.

Atividade da fosfatase alcalina:

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada pelo método descrito por Roy, 1970, foi mensurada após 7 dias de cultura, avaliando-se a quantidade de liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial (Labtest Diagnostica SA, Brasil). Foram utilizados tubos de ensaio, nos quais foram colocados 0,005 mL de substrato (monofosfato de timolftaleína) e 0,5 mL de solução tampão (0,3 mmol/mL de dietanolamina – pH 10,1). Os tubos foram mantidos a 37°C por dois minutos.

Decorrido este período, foi adicionado em cada tubo teste 0,005 mL de lauril sulfato de sódio obtido dos mesmos poços os quais foram mantidos a 37 °C por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 2 mL de reagente de cor para mensuração da absorbância em um espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 590 nm. Os resultados foram calculados como μmol de timolftaleína/mL e normalizados pela proteína total. Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

Análise estatística:

Esta análise entre as diferentes superfícies de titânio bem como entre os períodos avaliados (7 e 14 dias) foi realizada por meio do teste de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Para todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes foram realizados pelo programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, EUA).

5. Artigo Científico 1

Artigo elaborado segundo as normas da revista Clinical Oral Implants Research.

Avaliação do comportamento celular na presença de superfícies de titânio submetidas a diferentes tratamentos: análise *in vitro*.

Kely Cristina de Moraes¹, Fábio André dos Santos², Neide Kazue Kurumoto³, Carlos Laurindo⁴, Marcela Claudino²

¹ Cirurgiã-dentista, Mestranda, Departamento de Pós-graduação, Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico (ILAPEO), rua Jacarezinho 656, Curitiba, Paraná, Brasil.

² Cirurgião-dentista, Mestre e Doutor, Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), rua Carlos Cavalcanti 4748, Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

³ Física, Mestre e Doutora, Departamento de Física, Universidade Federal do Paraná (UFPR), rua Coronel Francisco Heráclito do Santos 210, Curitiba, Paraná, Brasil.

⁴ Engenheiro mecânico, Mestre, Departamento de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), rua Imaculada Conceição 1555, Curitiba, Paraná, Brasil.

Autor correspondente: Marcela Claudino

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Carlos Cavalcanti 4748, Ponta Grossa Paraná, Brasil. Telefone: +55 (42) 3220-3000

E-mail: marcelaclaudino@hotmail.com

Resumo

Objetivos: O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento de células da linhagem osteoblástica na presença de discos de titânio submetidos à diferentes tratamentos de superfície e caracterizar os discos quanto a rugosidade e molhabilidade. **Materiais e métodos:** Foram avaliados discos de titânio com superfícies lisas (grupo L), superfícies submetidas ao jateamento seguido por ataque ácido (grupo Jat) e superfícies submetidas ao aumento de molhabilidade (grupo Mol). Os discos foram caracterizados pela análise da topografia por MEV, a composição química através do EDS e a molhabilidade mensurada por goniômetro. Em culturas de osteoblasto-like ROS 17/2.8, foram realizados ensaios de adesão e viabilidade celular após 7 e 14 dias, bem como avaliação da atividade da fosfatase alcalina após 7 dias. **Resultados:** Para viabilidade e adesão celular, não houve diferença entre as superfícies (Jat e Mol) analisadas após 7 dias e 14 dias. Porém, foi observado uma tendência a aumento na viabilidade celular no grupo Mol após 14 dias. Na adesão celular, índices maiores foram observados nos discos grupo (Jat) com diferenças estatísticas em relação ao grupo (L) ($p < 0,001$). A atividade da fosfatase alcalina não revelou diferenças estatísticas significativas em todos os grupos. **Conclusão:** O tratamento de superfície resultou em aumento da rugosidade nos discos do grupo (Jat e Mol) e aumento da molhabilidade no grupo (Mol). Além disso, o comportamento de células de linhagem osteoblástica, foram influenciadas pelo tratamento de superfície, promovendo uma tendência a aumento na viabilidade grupo (Mol) e adesão celular nos discos grupo (Jat) e (Mol) em relação ao grupo (L).

Palavras-chave: Osseointegração, Implantes Dentários, Molhabilidade, Titânio.

Introdução

Os implantes osseointegráveis são atualmente considerados como tratamento de escolha para a reabilitação de pacientes edêntulos (Brånemark et al. 2001), os quais apresentam relevantes índices de sucesso (Adell et al. 1981; Buser et al. 1998), decorrentes da deposição óssea na superfície dos implantes, caracterizada como osseointegração (Kieswetter et al. 1996; Ivanovski et al. 2011). A deposição óssea pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: biocompatibilidade, aspectos referentes ao hospedeiro, a técnica cirúrgica e o controle das cargas após a instalação dos implantes. Além disso, características da superfície dos implantes parecem acentuar a deposição óssea (Morra et al. 2003; Zhao et al. 2006; Novaes et al. 2010).

Dentre estes tratamentos de superfície, o método mais utilizado é o jateamento da superfície seguido por um ataque ácido, visando aumentar a rugosidade da superfície. O jateamento com partículas específicas resulta em uma maior rugosidade, a qual é posteriormente atenuada pelo ataque ácido (Rupp et al. 2011; Novaes et al. 2010).

Estudos revelam que superfícies jateadas e submetidas ao ataque ácido apresentam maior contato a superfície do implante e o tecido ósseo (BIC) quando comparados à superfícies lisas (Buser et al. 1991; Trisi et al. 2003; Celetti et al. 2006). Da mesma forma, outros estudos *in vitro* (Bowers et al. 1992; Orsini et al. 2000; Rosa e Beloti 2003; Protivinsky et al. 2007; Lai et al. 2009; Osathanon et al. 2011; Singh et al. 2012) e *in vivo* (Buser et al. 1998; Bowers et al. 1992; Mardas et al. 2011; Arismendi et al. 2010) reforçam que superfícies tratadas com jateamento de partículas, submetidas ao ataque ácido apresentam resultados mais favoráveis referentes à deposição óssea e demais respostas celulares quando comparados com superfícies lisas. Desta forma, este

comportamento celular diferenciado, decorrente da modificação na superfície do titânio, parece exercer efeitos positivos no metabolismo ósseo.

Esta otimização no processo de osteointegração possivelmente se deve a modificações na superfície, uma vez que estudos *in vitro* demonstraram que o aumento na rugosidade de superfícies de titânio pode influenciar a proliferação e a diferenciação de osteoblastos (Bowers et al. 1992; Schwartz et al. 1999; Mamalis & Silvestros 2011; Osathanon et al. 2011; Singh, 2012). Esta modificação também parece aumentar a expressão de mediadores envolvidos na deposição óssea, tais como a fosfatase alcalina e a osteocalcina (Klein et al. 2010; Passeri et al. 2010; Conserva et al. 2010).

Além da rugosidade, estudos demonstraram que outras modificações na superfícies como o aumento na molhabilidade interferem na adsorção de proteína, a adesão celular e respostas celulares específicas (Zhao et al. 2006; Bosshardt et al. 2011). Assim, o aumento na molhabilidade das superfícies de titânio dos implantes dentários vem ganhando atenção como um fator que pode influenciar a resposta biológica (Perrin et al. 2002; Bornstein et al. 2005, Rupp et al. 2011). E ainda, o aumento na molhabilidade resultou em maior deposição óssea e aumento na expressão de proteínas osteogênicas (Klein et al. 2010; Bosshardt et al. 2011).

Entretanto, alguns autores não observaram modificações no processo de osteointegração na presença de diferentes tipos de tratamentos de superfície (Brunette, 1988; Gehrke et al. 2014). Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o comportamento de osteoblastos na presença de superfícies de titânio lisas, submetidas ao jateamento seguido por ataque ácido e superfícies com aumento de molhabilidade.

Materiais e Métodos

Superfícies analisadas:

Foram avaliados discos de titânio comercialmente puro grau IV com 6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura submetidos a diferentes tratamentos de superfície, sendo:

1. Grupo L: composto por discos com superfície lisa, os quais foram submetidos somente ao processo de usinagem. Ou seja, estes discos não foram submetidos a quaisquer tipos de tratamento de superfície.
2. Grupo Jat: composto por discos com superfície submetida ao jateamento seguido por ataque ácido (superfície Neoporos[®], Neodent, Curitiba, Brasil),
3. Grupo Mol: composto por discos com superfície submetida ao jateamento seguido por ataque ácido e com aumento da molhabilidade (superfície Acqua[®], Neodent, Curitiba, Brasil).

Os discos de titânio foram produzidos e esterilizados por radiação gama (Neodent[®], Curitiba, Brasil). Os discos foram armazenados dentro das embalagens em um ambiente seco e protegido da luz.

Caracterização das superfícies:

As superfícies analisadas foram caracterizadas por meio de análise da topografia e da molhabilidade. A análise micrométrica dos discos foram apresentados em escala micrométrica (Sa), onde a média e desvio padrão foram realizados em 3 amostras de cada grupo, sendo avaliado 4 regiões por amostra. A topografia de superfície dos discos de titânio foi avaliada utilizando Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) de alta

resolução (Field Emission Scanning Electron Microscope [FEG-SEM], Hitachi S-4700, Tóquio, Japão). A composição química das superfícies foi avaliada através de EDS (espectroscopia de energia dispersa) acoplado ao Microscópio Eletrônico de Varredura. A rugosidade da superfície foi avaliada utilizando microscópio confocal (Nanofocus Digital Instruments, Oberhausen, Alemanha), por meio do aumento de 20 vezes. A molhabilidade da superfície foi avaliada através da mensuração do ângulo de contato de uma gota (0,5mL) de água deionizada através do goniômetro (DSA10, Kruss, Hamburg, Alemanha), dispositivo medidor automático de ângulo de contato (Park et al. 2010). Os tempos utilizados para avaliação da formação de uma gota foram de 1, 7 e 15 segundos para cada grupo de disco analisado.

Cultura de células de osteoblásticas:

A linhagem celular utilizada neste estudo foi a linhagem de osteoblastos ROS 17/2.8 de ratos, previamente obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA). As células foram mantidas em nitrogênio líquido (criopreservação) em solução de congelamento composta por meio *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF). Para a realização dos ensaios, as células foram descongeladas à temperatura ambiente e expandidas em dois frascos (garrafas) de cultura celular de 25cm² (Corning Glass Workers, New York, EUA) em meio DMEM completo em estufa incubadora umidificada na temperatura de 37°C contendo 95% de oxigênio e 5% de CO₂. A proliferação destas células foi monitorada com o uso de microscópio invertido Olympus IX51 (Olympus Optical, Tóquio, Japão).

Após a formação da monocamada de células, o meio DMEM-s (suplementado) das garrafas foi descartado com o auxílio de uma pipeta sorológica, sendo os frascos lavados com 10 mL de solução de salina tamponada com fosfato (PBS), a fim de evitar que células mortas fossem plaqueadas. Após a aspiração do PBS, foram adicionados 3 mL de solução de tripsina 0,05% + EDTA 0,02% e os frascos foram mantidos por 3 minutos na estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 3 minutos com o objetivo de desaderir as células. Em seguida, foi adicionado em cada frascos e 3 mL de DMEM-s.

O meio de cultura contendo as células desaderidas pela tripsina foi removido e pipetado em dois tubos do tipo Falcon esterilizados com capacidade de 10 mL. Os frascos foram centrifugados a 1200 rpm durante 10 minutos para separação das células do meio, resultando na formação de um *pellet* de células no fundo do tubo. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 10 mL de meio DMEM foi adicionado nos tubos contendo as células.

A contagem global de células foi efetuada na câmara de Neubauer, partindo-se da suspensão de células obtida. Foram utilizados 10 uL desta solução, na qual foi adicionado 10 uL da solução de Azul de Trypan a 1% para avaliação da viabilidade celular e para a contagem total do número de osteoblastos. A contagem foi realizada nas duas câmaras de um hemocitómetro, sendo que cada câmara recebeu 10 uL desta nova suspensão de células com a solução de Azul de Trypan. A contagem das células foi realizada em microscópio de fase invertido. As células viáveis foram caracterizadas pela ausência da marcação com o Azul de Trypan, sendo que células não viáveis mostraram-se marcadas em azul. O número total de células viáveis originárias do frasco foi obtido através da seguinte equação matemática: Número total de células viáveis contadas x diluição no azul de Tripan x 10⁴ / Número de quadrados do hemocitómetro usados para contagem.

Com base na concentração de células, procedeu-se a diluição visando obter uma concentração de $1,0 \times 10^3$ células/mL em DMEM + 1% de SFB. Esta solução de células foi colocada em placas de cultura de 96 poços, nos quais os discos de titânio foram previamente inseridos. A placa foi mantida por 7 e 14 dias a 37°C, com 95% de oxigênio e 5% de CO₂ com troca do meio a cada 48 horas.

Viabilidade Celular – Método MTT:

A viabilidade celular foi avaliada nos diferentes grupos pelo ensaio colorimétrico MTT (Sigma Aldridge, São Paulo, Brasil) após 7 e 14 dias do plaqueamento das células de acordo com (Mosmann, 1983). Foram preparadas alíquotas de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) a 5 mg/ml, as quais foram adicionadas em cada poço do meio de cultura por 3 horas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse período, o sobrenadante de cada poço foi retirado, sendo substituído por 200 µl de etanol absoluto e mantido a temperatura ambiente até a completa solubilização do precipitado formado para medida colorimétrica em espectrofotômetro (570nm; µQuanti, Bio-tek Instruments, Inc). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem e comparada ao grupo controle. Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

Adesão Celular – Método MTT:

Foi avaliada nos diferentes grupos pelo ensaio colorimétrico MTT (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) nos períodos de 7 e 14 dias (Mosmann, 1983). Porém, para a análise de

adesão celular, os discos foram removidos dos poços e transferidos para um novo poço em outra placa de 96 poços. Esta transferência foi realizada para assegurar que a contagem de células aderidas não incluísse as células aderidas à parede dos poços. Assim sendo, foram contadas somente as células aderidas aos discos de titânio. A adesão celular foi expressa em número de células e comparada ao grupo controle nos dias avaliados, foram utilizada apenas as células sem a presença das amostras de titânio. Os experimentos foram realizados em quintuplicata.

Atividade da fosfatase alcalina:

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada pelo método descrito por (Roy, 1970), mensurada após 7 de cultura, avaliando-se a quantidade de liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial (Labtest Diagnostica SA, Brasil). Juntamente às amostras deste estudo, um controle positivo e negativo fornecidos pelo fabricante foram utilizados nos experimentos para assegurar a confiabilidade dos resultados. Foram utilizados tubos de ensaio, nos quais foram colocados 0,005 mL de substrato (monofosfato de timolftaleína) e 0,5 mL de solução tampão (0,3 mmol/mL de dietanolamina – pH 10,1). Os tubos foram mantidos a 37°C por dois minutos.

Decorrido este período, foi adicionado em cada tubo teste 0,005 mL de lauril sulfato de sódio obtido dos mesmos poços utilizados para a medida de proteína total, os quais foram mantidos a 37°C por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 2 mL de reagente de cor para mensuração da absorbância em um espectrofotômetro, utilizando o

comprimento de onda de 590 nm. Os resultados foram calculados como μmol de timolftaleína/mL. Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

Análise estatística:

Esta análise entre as diferentes superfícies de titânio bem como entre os períodos avaliados (7 e 14 dias) será realizada por meio do teste de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Para todas as análises, valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significantes. Todos os testes serão realizados pelo programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, EUA).

Resultados

1. Caracterização das superfícies

A caracterização das superfícies foi realizada em 3 amostras, sendo que se avaliou 4 regiões de cada disco. Os discos de superfície lisa apresentaram rugosidade menor quando comparados aos discos oriundos dos grupos Jat e Mol. Os valores de rugosidade dos grupos estão descritos na tabela 1 em escala micrométrica (Sa).

A análise por microscopia eletrônica de varredura foi realizada no quadrante superior direito, reforçando os resultados de maior rugosidade superficial nos grupos submetidos ao tratamento de superfície (grupos Jat e Mol) (Figs. 1, 2 e 3)

Tabela 1. Mensurações de rugosidade em discos dos grupos L, Jat e Mol.

Grupos avaliados	Grupo Liso	Grupo Jat	Grupo Mol
Amostra 1	0,50	1,23	1,08
Amostra 2	0,55	1,21	1,06
Amostra 3	0,56	1,22	1,06
Média	0,53	3,66	3,20
Desvio Padrão	0,03	0,01	0,01

* Os dados estão apresentados em μm .

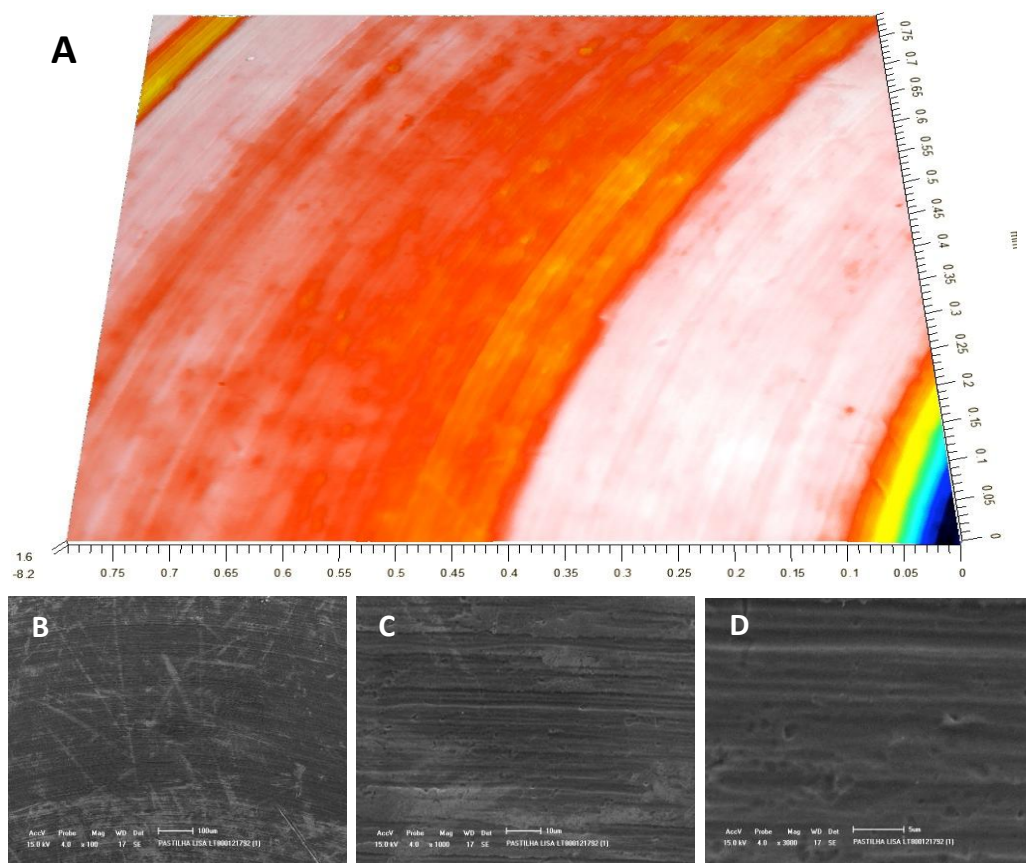


Fig. 1. Representação ilustrativa referente a rugosidade superficial nos discos do grupo L.

A rugosidade superficial dos discos de titânio foram avaliados por microscopia confocal (A) e por microscopia eletrônica de varredura nos aumentos de 100 vezes (B), 1000 vezes (C) e aumento de 3000 vezes (D).

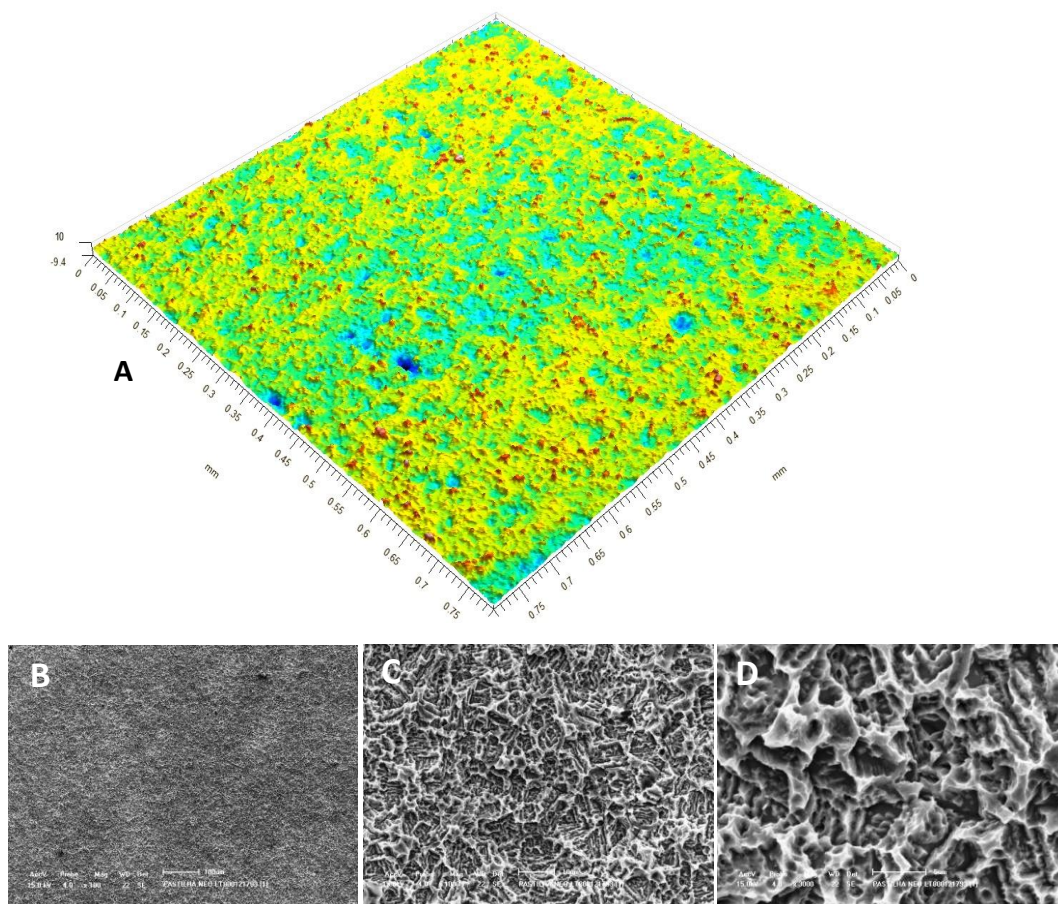


Fig. 2. Representação ilustrativa referente a rugosidade superficial nos discos do grupo Jat.

A rugosidade superficial dos discos de titânio foram avaliados por microscopia confocal (A) e por microscopia eletrônica de varredura nos aumentos de 100 vezes (B), 1000 vezes (C) e aumento de 3000 vezes (D).

Grupo L - Amostra 1

Element	Intensity	Weight%	AT%	K-Value	Z	A	F
Ti	74.661	100.000	100.000	0.89418	1.00000	1.00000	1.00000
Total		100.000	100.000	0.89418			

Grupo L - Amostra 2

Element	Intensity	Weight%	AT%	K-Value	Z	A	F
Ti	76.352	100.000	100.000	0.91444	1.00000	1.00000	1.00000
Total		100.000	100.000	0.91444			

Grupo L - Amostra 3

Element	Intensity	Weight%	AT%	K-Value	Z	A	F
Ti	73.273	100.000	100.000	0.87756	1.00000	1.00000	1.00000
Total		100.000	100.000	0.87756			

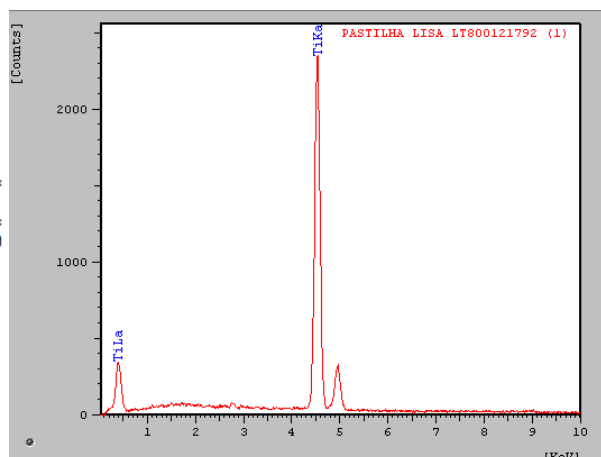


Fig. 4. Avaliação da composição química de discos de titânio do grupo L. Os discos de titânio foram submetidos à espectrometria de energia dispersiva (EDS), evidenciando o alto grau de pureza do titânio.

Grupo Jat - Amostra 1

Element	Intensity	Weight%	AT%	K-Value	Z	A	F
Ti	59.264	100.000	100.000	0.70979	1.00000	1.00000	1.00000
Total		100.000	100.000	0.70979			

Grupo Jat - Amostra 2

Element	Intensity	Weight%	AT%	K-Value	Z	A	F
Ti	71.879	100.000	100.000	0.86087	1.00000	1.00000	1.00000
Total		100.000	100.000	0.86087			

Grupo Jat - Amostra 3

Element	Intensity	Weight%	AT%	K-Value	Z	A	F
Ti	71.469	100.000	100.000	0.85596	1.00000	1.00000	1.00000
Total		100.000	100.000	0.85596			

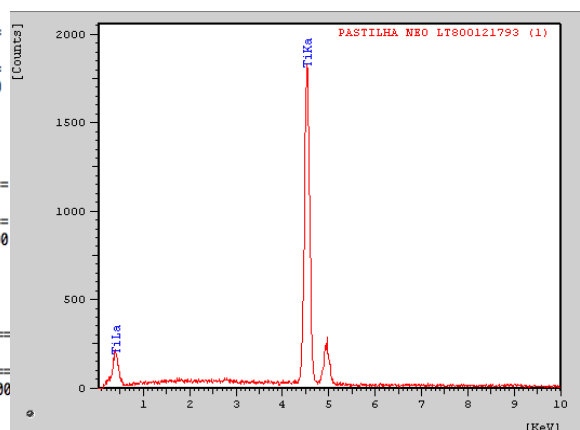


Fig. 5. Avaliação da composição química de discos de titânio do grupo Jat. Os discos de titânio foram submetidos à espectrometria de energia dispersiva (EDS), evidenciando o alto grau de pureza do titânio.

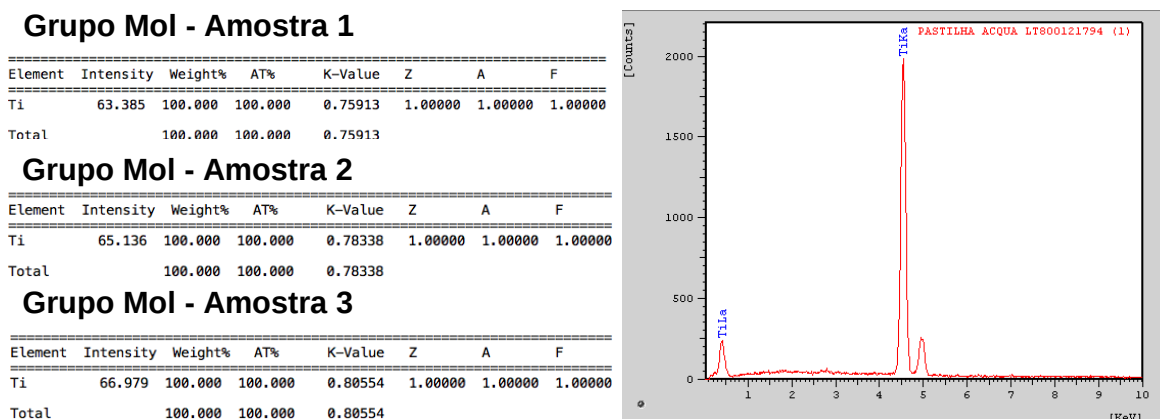


Fig. 6. Avaliação da composição química de discos de titânio do grupo Mol. Os discos de titânio foram submetidos à espectrometria de energia dispersiva (EDS), evidenciando o alto grau de pureza do titânio.

Em relação à avaliação de molhabilidade ($n=3$), os valores médios do ângulo da gota na superfície dos discos do grupo L foi de $98,3^\circ \pm 4,07^\circ$ (Fig. 7 e Tabela 4). Já os discos provenientes dos grupos Jat apresentaram valores médios de $126,06^\circ \pm 7,28^\circ$. Os discos pertencentes ao grupo Mol apresentaram molhabilidade total, ou seja, espalhamento total do líquido sem formação de gota (Figs. 8, 9 e tabela 4).

Tabela 4. Mensurações de molhabilidade nos discos dos grupos L, Jat e Mol.

Grupos analisados	Grupo Liso	Grupo Jat	Grupo Mol
Amostra 1	96,3	127,34	0
Amostra 2	95,62	132,63	0
Amostra 3	103	118,22	0
Média	98,30	126,06	0
Desvio Padrão	4,07	7,28	0

* Os valores estão apresentados em graus.

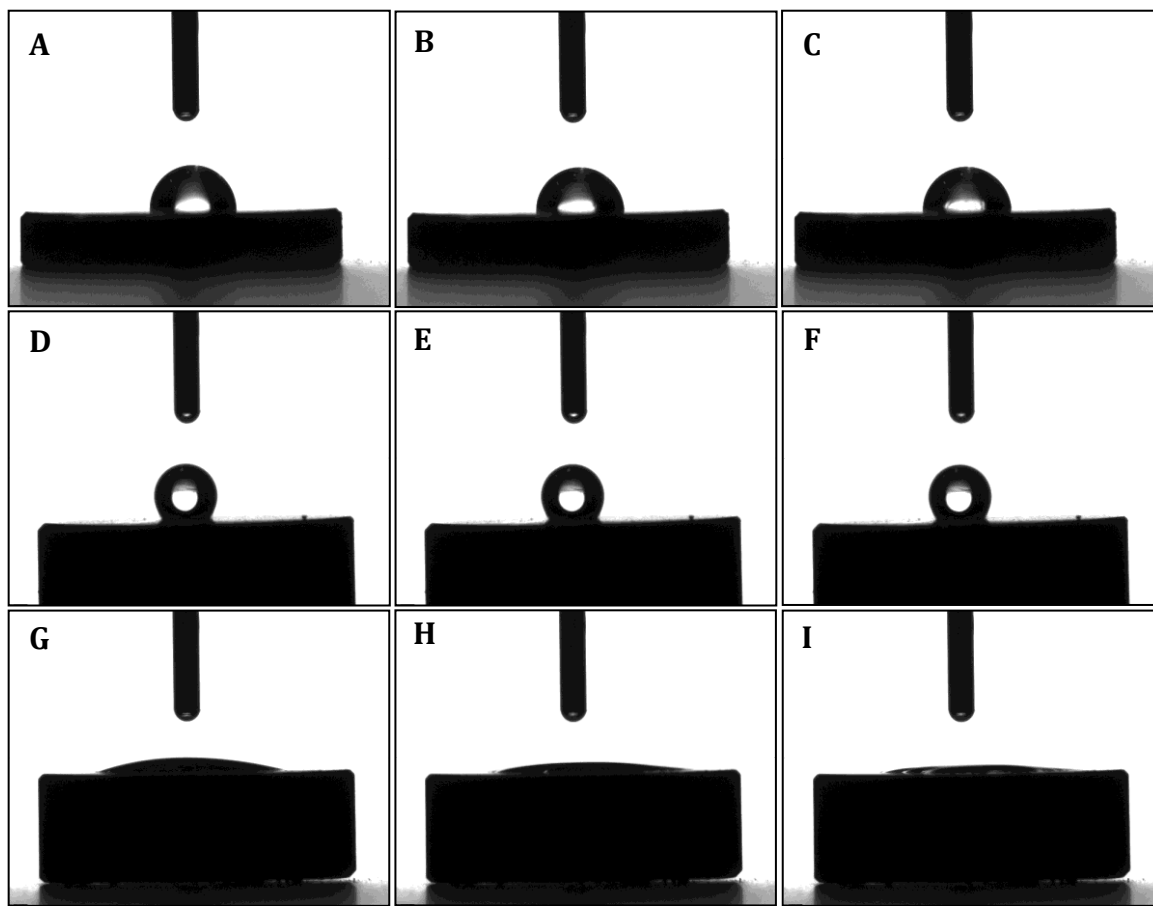
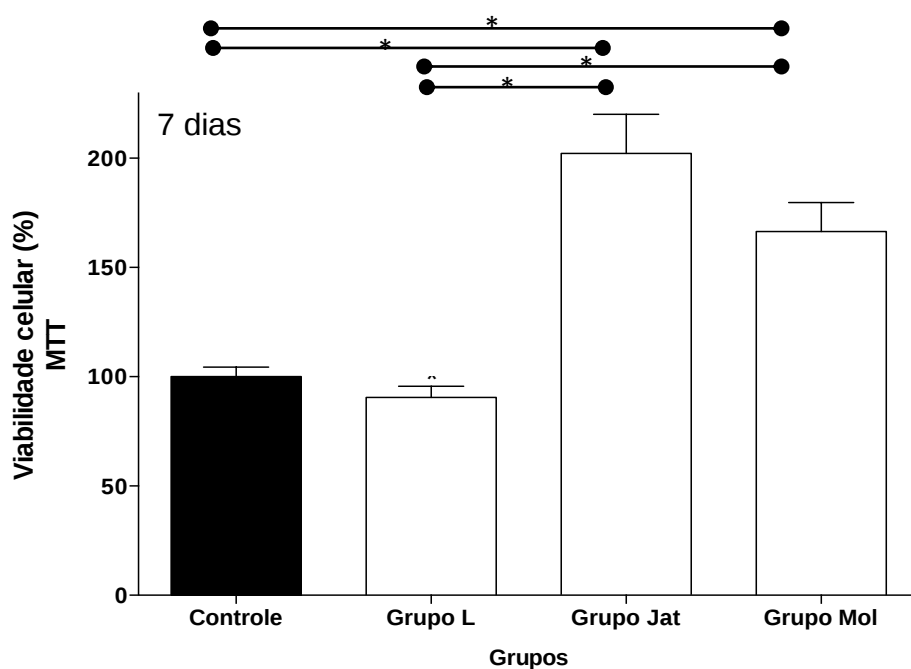


Fig. 7. Avaliação da molhabilidade de discos de titânio do grupo L (A,B,C); Jat (D,E,F) e Mol (G,H,I). A mensuração do ângulo formado entre a porção superior da gota com a superfície foi mensurada em 15 segundos, sendo que as mensurações realizadas após 1 (A,D,G), 7 (B,E,H) e 15 (C,F,I) segundos.

Viabilidade Celular – Método MTT:

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados pelo método MTT após 7 e 14 dias do plaqueamento das células nos poços contendo discos de titânio. Após 7 dias, os grupos Jat e Mol apresentou contagens mais elevadas de viabilidade celular quando comparado ao grupo L. Os grupos Jat e Mol não apresentaram diferenças significativas entre si (Fig. 8A). Após 14 dias, observou-se aumento na viabilidade celular no grupo Mol

em relação ao grupo L, entretanto, o grupo Jat obteve a maior redução aos 14 dias quando comparado aos 7 dias. O grupo Mol também apresentou tendência a aumento na viabilidade celular quando comparado ao grupo Jat. (Fig.8B). Ao avaliar os dados obtidos entre 7 e 14 dias dentro de um mesmo grupo, foi observada redução nos períodos de 14 dias em todos os grupos avaliados.



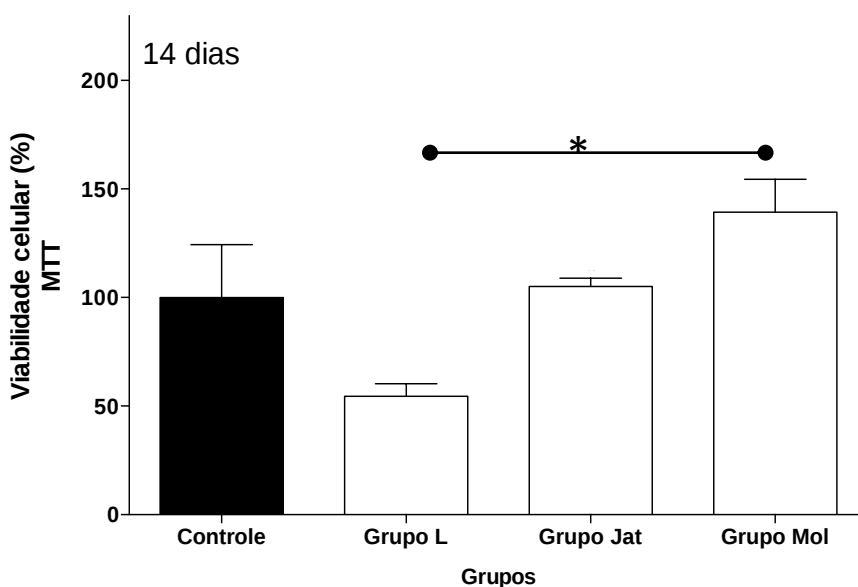
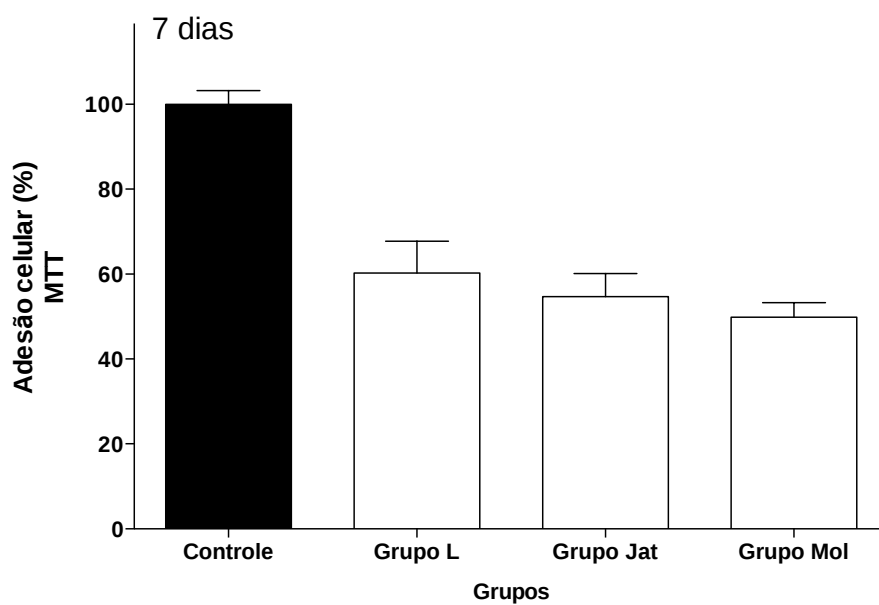


Fig. 8. Avaliação da viabilidade celular na presença de discos de titânio submetidos a diferentes tratamentos de superfície. Os ensaios de viabilidade celular foram realizadas pelo método MTT após 7 (A) e 14 (B) dias em culturas de células de linhagem osteoblástica. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$.

Adesão celular – Método MTT

Os ensaios de adesão celular foram realizados pelo método MTT após 7 e 14 dias do plaqueamento das células nos poços contendo discos de titânio. Após 7 dias, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos L, Jat e Mol (Fig. 9A). Após 14 dias, os grupos Jat e Mol apresentaram aumento em relação ao grupo L. Apesar da ausência de diferenças significativas, foi observado uma tendência a aumento na adesão celular no

grupo Jat quando comparado ao grupo Mol (Fig. 9B). O grupo controle apresentou maior adesão que os grupos L, Jat e Mol em todos os tempos analisados.



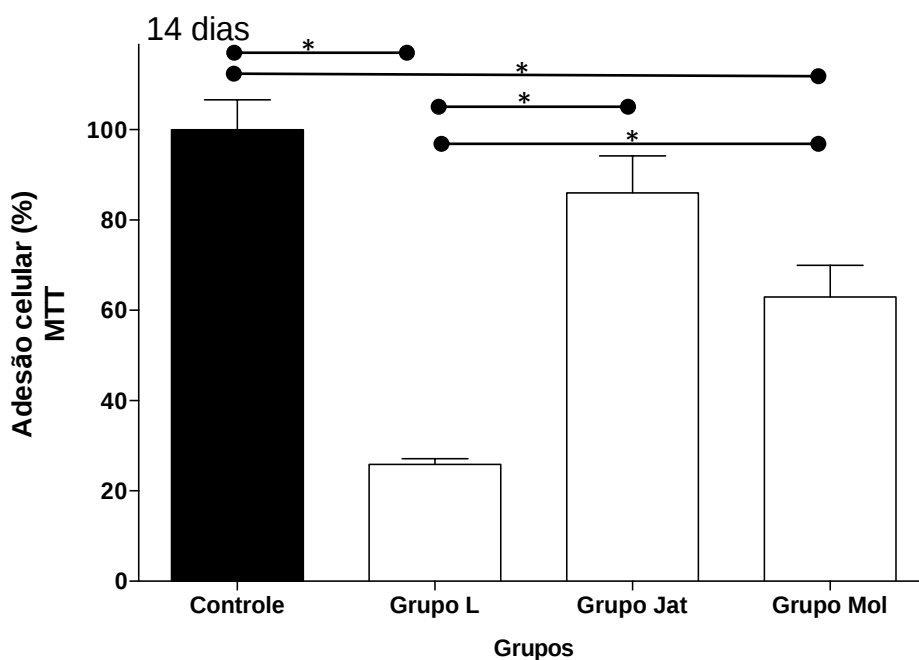


Fig. 9. Avaliação da adesão celular na presença de discos de titânio pertencentes ao grupo L, Jat e superfície Mol. Os ensaios de adesão celular foram realizadas pelo método MTT após 7 (A) e 14 (B) dias em culturas de células de linhagem osteoblástica. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$.

Atividade de fosfatase alcalina

A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada por meio da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato. Juntamente às amostras deste estudo, os experimentos também foram realizados com um controle positivo e um controle negativo fornecidos pelo fabricante. Os resultados obtidos com este controle demonstraram a confiabilidade dos experimentos. Além disso, foram avaliadas células coletadas dos poços que não possuíam discos de titânio, ou seja, poços que continham somente células.

Estas amostras foram consideradas como o controle da placa de cultura. Analisando os resultados obtidos após 7 dias de cultura, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos L, Jat e Mol, no entanto, as diferenças foram verificadas entre os grupos controle e fornecidos pelo fabricante (Fig. 10).

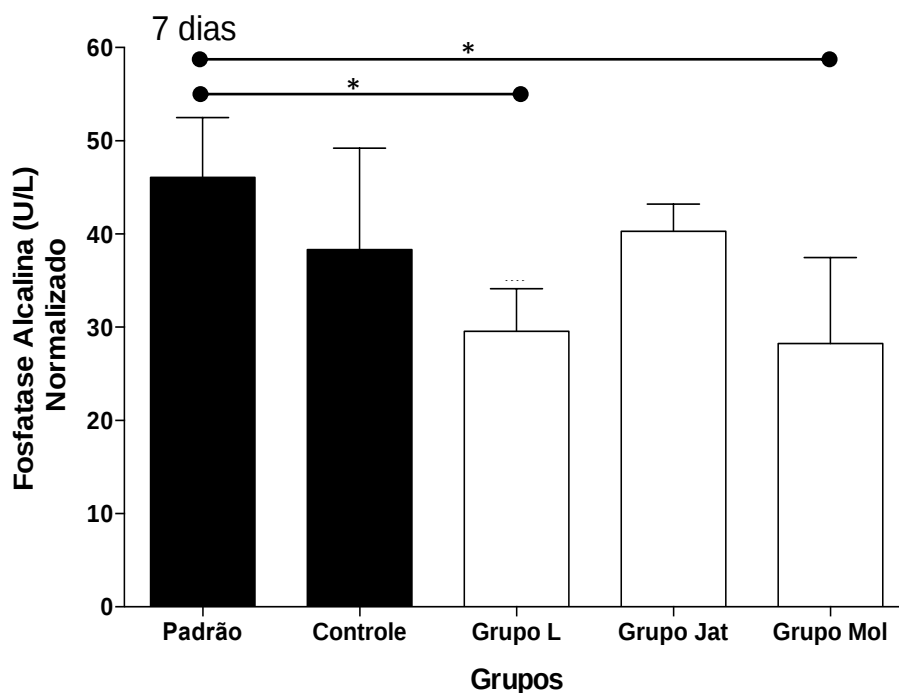


Fig. 10. Atividade da fosfatase alcalina na presença de discos de titânio submetidos a diferentes tratamentos de superfície. Os ensaios de atividade da fosfatase alcalina foram baseados na liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato após 7 dias. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$.

Discussão

A deposição óssea sobre a superfície de titânio requer o recrutamento de células precursoras dos osteoblastos, seguido por sua adesão, proliferação e diferenciação em

osteoblastos. Estas células atuam na síntese de matriz extracelular não mineralizada bem como na calcificação desta matriz (Kieswetter et al. 1996; Mendonça et al. 2009; Silva et al. 2009; Togashi et al. 2009; Conserva, Lanuti & Menine 2010). Assim, os tratamentos de superfície vem sendo desenvolvidos com o intuito de estimular o metabolismo de células ósseas (Buser et al. 1998; Abrahamsson et al. 2004; Wall et al. 2009; Klein et al. 2010; Iezzi et al. 2012). Neste estudo, foram avaliados aspectos referentes à adesão e viabilidade celular, bem como, a atividade de fosfatase alcalina em superfícies de titânio submetidas a diferentes tratamentos de superfície.

Os experimentos realizados neste estudo revelaram aumento na viabilidade celular na presença de discos de titânio submetidos ao jateamento seguido por ataque ácido (grupo Jat) e com aumento de molhabilidade (grupo Mol), sendo que este, apresentou uma tendência ao aumento no número de células viáveis. No entanto, (Togashi et al. 2009) realizaram um estudo comparativo analisando a viabilidade em superfícies lisas, SLA (nome comercial de superfície submetida ao jateamento e duplo ataque ácido) e SLActive (nome comercial de superfície submetida ao jateamento e duplo ataque ácido com aumento de molhabilidade) na presença e na ausência do tratamento com a proteína óssea recombinante humana-7 (rhBMP-7). Após 24 horas, não foram observadas diferenças significativas quanto à viabilidade celular entre os grupos avaliados. Porém, Kieswetter et al. (1996) relataram que a viabilidade celular é inversamente proporcional a rugosidade superficial. Além disso, estes autores analisaram diferentes níveis de rugosidade sendo: EP (polimento elétrico), TP (superfície pré-tratada com duplo ataque com ácido fluorídrico e nítrico), FA (jateamento com partículas fina), CA (jateamento com partículas grossas), TPS (pulverizado com spray de plasma Ti). Assim, foi demonstrado que superfícies de maior rugosidade apresentaram uma tendência a redução na viabilidade celular, concluindo que a viabilidade é influenciada pelo tratamento de superfície.

No que se refere aos experimentos de adesão celular, não houve diferença entre as superfícies analisadas após 7 dias. Após 14 dias, a ausência de diferenças entre os grupos se manteve. Porém, foi observado uma tendência a aumento na adesão celular nos discos com aumento de molhabilidade. De fato, esta tendência pode ser embasada em estudos que demonstram aumento na adesão celular em discos de titânio com superfície tratada (Bowers et al. 1992; Orsini et al. 2000; Nishimoto et al. 2008; Conserva, Lanuti & Menine 2010; Passeri et al. 2010). Sammos et al. (2005) e Protivínsky et al. (2007) relataram que a adesão e proliferação não estão relacionados apenas a rugosidade e morfologia, mas também a composição química da superfície. Nestes resultados, os autores demonstraram que superfícies com aumento de molhabilidade apresentaram maior adesão celular quando comparados à superfícies lisas e superfícies submetidas ao jateamento seguido por ataque ácido. Entretanto, outros autores não encontraram diferenças na adesão em superfícies lisas com superfícies tratadas com ataque ácido após 18 horas (Carneiro-Campos et al. 2010). Além disso, Mustafa et al. (2001) não observaram diferenças na adesão celular após 3 horas de cultura na presença de discos de titânio com diferentes rugosidades.

Orsini et al. (2000) afirmaram que a rugosidade tem efeito direto na adesão celular, pois osteoblastos são influenciados pela topografia na sua conformação, características que são importantes na adesão celular. Da mesma forma, Bowers et al. (1992) afirmaram que quanto mais irregular a superfície, maior sua capacidade de adesão. Em contrapartida, (Mamalis & Silvestros 2011) analisaram superfícies lisas, SLA e SLActive pelo método de MTT, revelando maior adesão celular em superfícies lisas após 3 e 24 horas em cultura. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre as superfícies SLA e SLActive.

E ainda, os ensaios de atividade de fosfatase alcalina não revelaram diferenças entre os grupos. Resultados semelhantes foram previamente descritos comparando

superfícies jateadas e com aumento da molhabilidade quanto à atividade da fosfatase alcalina nos tempos de 3, 7 e 10 dias (Conserva, Lanuti & Menine 2010). Os resultados obtidos por estes autores revelaram ausência de diferenças significativas entre os grupos analisados. Da mesma forma, Mustafa et al. (2001) não encontraram diferenças significativas avaliando a atividade de fosfatase alcalina na presença de discos de titânio com diferentes rugosidades após 10 dias em cultura.

Neste contexto, Klein et al. (2010) observaram aumento na atividade de fosfatase alcalina após 21 dias de cultura na presença de discos com aumento de molhabilidade, quando comparados à superfície submetida ao jateamento seguido por duplo ataque ácido. Entretanto, esta diferença não foi observada após 7 e 14 dias. Protivinsky et al. (2007) avaliaram os níveis de fosfatase alcalina em superfícies lisas, jateadas e submetidas ao ataque ácido após 1, 6, 12, 18 e 24 dias. Os resultados demonstraram diferenças significativamente aumentadas entre as superfícies jateadas e condicionadas com ácido em comparação as lisas nos períodos 1, 6 e 12, sem diferenças entre elas. Contudo, não foram identificadas diferenças entre todos os grupos após 18 e 24 dias.

Klinger et al. (2011) examinaram a atividade da ALP em superfícies maquinadas, rugosas (jateamento e ataque ácido) e modificadas com flúor. Os resultados demonstraram que a atividade da ALP em superfícies modificadas com flúor foi maior em comparação as não modificadas.

Assim sendo, observa-se que, em um contexto geral, o tratamento de superfície resulta em otimização do comportamento de células da linhagem osteoblástica *in vitro*. Os tratamentos de superfície avaliados neste estudo resultaram em aumento na rugosidade superficial. De fato, estudos mostram que a rugosidade promovida pelo jateamento permite uma maior área de contato e pode estar relacionada com aumento da diferenciação dos osteoblastos (Masaki et al. 2005; Novaes et al. 2010; Klinger et al. 2011). Além disso, o

condicionamento com ácido que promove melhor adsorção inicial da proteína e adesão celular, entretanto diminui a proliferação (Silva et al. 2009; Wall et al. 2009).

No entanto, a molhabilidade é fortemente dependente da energia superficial livre, sendo que o aumento de molhabilidade aumenta a interação entre a superfície do implante com o microambiente do leito ósseo (Kilpadi & Lemons 1994). Estas modificações parecem acentuar a deposição, reduzindo o tempo de osteointegração (Buser et al. 2004; Wennenberg et al. 2009; Gil et al. 2014). Ao contrário, Gehrke et al. (2014), sugeriram que a molhabilidade é inversamente proporcional à quantidade e qualidade de formação óssea.

Analisando os dados em conjunto, é possível perceber que o tratamento de superfície resultou em aumento da rugosidade e molhabilidade dos discos analisados, com isso, o comportamento de células de linhagem osteoblásticas, foram influenciadas pelo tratamento de superfície *in vitro*, promovendo uma tendência a aumento na viabilidade grupo (Mol) e adesão celular nos discos grupo (Jat) e (Mol) em relação ao grupo (L). Entretanto, é de fundamental importância que outros estudos sejam realizados, visando elucidar os mecanismos biológicos envolvidos no comportamento diferencial destas células na presença de discos de titânio com superfície tratada. Estes dados certamente contribuirão para o desenvolvimento de estratégias mais efetivas para a reabilitação de pacientes edêntulos com leitos ósseos de densidade reduzida.

Referências

1. Abrahamsson, I., Berglundh, T., Linder, E., Lang, N.P. & Lindhe, J. (2004) Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 381-392.
2. Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B. & Brånemark, P.I. (1981) A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *International Journal of Oral Surgery* **10**: 387-416.

3. Arismendi, J.A., Mesa, A.L., García, L.P., Salgado, J.F., Castaño, C. & Mejía, R. (2010) Estudio comparativo de implantes de superficie lisa y rugosa. Resultados a 36 meses. *Revista Facultad De Odontología Universidad De Antioquia* **21**: 159-169.
4. Bornstein, M.M., Schmid, B., Belser, U.C., Lussi, A. & Buser, D. (2005) Early loading of non-submerged titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: 5-year results of a prospective study in partially edentulous patients. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 631-638.
5. Bosshardt, D.D., Salvi, G.E., Huynh-Ba, G., Ivanovski, S., Donos, N. & Lang, N.P. (2011) The role of bone debris in early healing adjacent to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in man. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 357-364.
6. Bowers, K.T., Keller, J.C., Randolph, B.A., Wick, D.G. & Michaels, C.M. (1992) Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *International Journal Oral Maxillofacial Implants* **7**: 30-47.
7. Brånemark, R., Brånemark, P.I., Rydevik, B. & Myers, R.R. (2001) Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. *Journal of Rehabilitation Research and Development* **38**: 175-181.
8. Brunette, D.M. (1988) The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *International Journal Oral Maxillofacial Implants* **3**: 231-246.
9. Bryant, S.R. & Zarb, G.A. (2002) Outcomes of implant prosthodontic treatment in older adults. *Journal Canadian Dental Association* **68**: 97-102.
10. Buser, D., Brogini, N., Wieland, M., Schenk, R.K., Denzer, A.J., Cochran, D.L., Hoffmann, B., Lussi, A. & Steinemann, S.G. (2004) Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *Journal of Dental Research* **83**: 529-533.
11. Buser, D., Nydegger, T., Hirt, H.P., Cochran, D.L. & Nolte, L.P. (1998) Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *International Journal Oral Maxillofacial Implants* **13**: 611-619.
12. Buser, D., Schenk, R.K., Steinemann, S., Fiorellini, J.P., Fox, C.H. & Stich, H. (1991) Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *Journal Biomedical Materials Research* **25**: 889-902.
13. Carneiro-Campos, L., Fernandes, C., Balduino, A., Duarte, M. & Leitão, M. (2010) The effect of titanium topography features on mesenchymal human stromal cells' adhesion. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 250-254.
14. Celletti, R., Marinho, V.C., Traini, T., Orsini, G., Bracchetti, G., & Perrotti, A. et al. (2006) Bone contact around osseointegrated implants: a histologic study of acid-etched and machined surfaces. *Journal of long-term effects of medical Implants* **16**: 131-43.

15. Conserva, E., Lanuti, A. & Menini, M. (2010) Cell behavior related to implant surfaces with different microstructure and chemical composition: an in vitro analysis. *International Journal Oral Maxillofacial Implants* **25**: 1099-1107.
16. Gehrke SA, Zizzari VL, Iaculli F, Mortellaro C, Tetè S, Piattelli A. (2014) Relationship between the surface energy and the histologic results of different titanium surfaces. *J Craniofac Surg.* **25**: 863-7.
17. Gil F, Manzanares N, Badet A, Aparicio C, Ginebra M. (2014) Biomimetic treatment on dental implants for short-term bone regeneration. *Clinical Oral Investigations* **18** (1): 59-66.
18. Iezzi G., Vantaggiato G., Shibli J., Fiera E., Falco A., Perrptti V., et al. (2012) Machined and sandblasted human dental implants retrieved after 5 years: A histologic and histomorphometric analysis of three cases. *Quintessence International* **43**: 287-292.
19. Ivanovski, S., Hamlet, S., Salvi, G.E., Huynh-Ba, G., Bosshardt, D.D. & Lang, N.P. et al. (2011) Transcriptional profiling of osseointegration in humans. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 373–381.
20. Jaffin, R.A. & Berman, C.L. (1991) The excessive loss of Brånemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. *Journal Periodontology* **62**: 2–4.
21. Kieswetter, K., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Cochran, D.L., Simpson, J., Dean, D.D. & Boyan, B.D. (1996) Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *Journal of Biomedical Material Research* **32**: 55-63.
22. Kilpadi, D.V. & Lemons, J.E. (1994) Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. *Journal of Biomedical Material Research* **28**: 1419-1425.
23. Klein, M.O., Bijelic, A., Toyoshima, T., Gotz, H., Von Koppenfels, R.L. & Al-Nawas, B. (2010) Long-term response of steogenic cells on micron and submicronscaled-structured hydrophilic titanium surfaces: sequence of cell proliferation and cell differentiation. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 642-649.
24. Klinger, A., Tadir, A., Halabi, A. & Shapira, L. (2011) The effect of surface processing of titanium implants on the behavior of human osteoblast-like saos-2 cells. *Clinical Implant Dentistry & Related Research* **13**: 64-70.
25. Lai, H.C., Zhuang, L.F., Zhang, Z.Y., Wieland, M. & Liu, X. (2009) Bone apposition around two different sandblasted, large-grit and acid-etched implant surfaces at sites with coronal circumferential defects: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 247-253.
26. Mamalis, A.A. & Silvestros, S.S. (2011) Analysis of osteoblastic gene expression in the early human mesenchymal cell response to a chemically modified implant surface: an in vitro study. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 530-537.

27. Mardas, N., Schwarz, F., Petrie, A., Hakimi, A., & Donos, N. (2011) The effect of SLActive surface in guided bone formation in osteoporotic-like conditions. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 406-415.
28. Masaki, C., Schneider, G., Zaharias, R., Seabold, D. & Stanford, C. (2005) Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 650-656.
29. Mendonça, G., Mendonça, D.B., Simões, L.G., Araújo, A.L., Leite, E.R., Duarte, W.R., Aragão, F.J. & Cooper, L.F. (2009) The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. *Biomaterials* **30**: 4053-4062.
30. Morra, M., Cassinelli, C., Bruzzzone, G., Carpi, A., di Santi, G. & Giardino R, et al. (2003) Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 1. Surface Analysis. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* **18**: 40-45.
31. Mosmann, Tim (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**: 55-63.
32. Mustafa, K., Wennerberg, A., Wroblewski, J., Hultenby, K., Lopez, B.S., Arvidson, K. (2001) Determining optimal surface roughness of TiO(2) blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clinical Oral Implants Research* **12**: 515-525.
33. Nishimoto, S.K., Nishimoto, M., Park, S.W., Lee K.M., Kim, H.S., Koh, J.T., et al. (2008) Yongxing L. & Yunzhi Y. (2008) The effect of titanium surface roughening on protein absorption, cell attachment, and cell spreading. *International Journal of Oral Maxillofac Implants* **24**: 675-680.
34. Novaes, A.B., Jr de Souza S.L., de Barros, R.R., Pereira, K.K., Iezzi, G. & Piattelli, A. (2010) Influence of implant surfaces on osseointegration. *Brazilian Dental Journal* **21**: 471-481.
35. Orsini, G., Assenza, B., Scarano, A., Piattelli, M. & Piattelli, A. (2000) Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. *International Journal of Oral Maxillofac Implants* **15**: 779-784.
36. Osathanon, T., Bessinyowong, K., Arksornnukit, M., Takahashi, H. & Pavasant, P. (2011) Human osteoblast-like cell spreading and proliferation on Ti-6Al-7Nb surfaces of varying roughness. *Journal Oral Science* **53**: 23-30.
37. Park JW, Kim YJ, Jang JH. (2010) Enhanced osteoblast response to hydrophilic strontium and/or phosphate ions-incorporated titanium oxide surfaces. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 398-408.

38. Passeri, G., Cacchioli, A., Ravanetti, F., Galli, C., Elezi, E. & Macaluso, G.M. (2010) Adhesion pattern and growth of primary human osteoblastic cells on five commercially available titanium surfaces. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 756-765.
39. Perrin, D., Szmukler-Moncler, S., Echikou, C., Pointaire, P. & Bernard, J.P. (2002) Bone response to alteration of surface topography and surface composition of sandblasted and acid etched (SLA) implants. *Clinical Oral Implants Research* **13**: 465-469.
40. Rosa, A.L. & Beloti, M.M. (2003) Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. *Brazilian Dental Journal* **14**: 16-21.
41. Protivínský, J., Appleford, M., Strnad, J., Helebrant, A., Ong, J.L. (2007) Effect of chemically modified titanium surfaces on protein adsorption and osteoblast precursor cell behavior. *International Oral Maxillofacial Implants* **22**: 542-550.
42. Rupp, F., Sheideler, L., Eichler, M. & Geirs-Gerstorfer, J. (2011) Wetting behavior of dental implants. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* **26**: 1256-1266.
43. Sammons, R.L., Lumbikanonda, N., Gross, M., Cantzler, P. (2005) Comparison of osteoblast spreading on microstructured dental implant surfaces and cell behaviour in an explant model of osseointegration. A scanning micrographic study. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 657-666.
44. Schwartz, Z., Lohmann, CH., Oefinger, J., Bonewald, LF., Dean, DD. & Boyan, BD. (1999) Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Advances in Dental Research* **13**: 38-48.
45. Sennerby, L., Thomsen, P. & Ericson, LE. (1992) A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* **7**: 62-71.
46. Silva, T.S., Machado, D.C., Viezzer, C., Silva Júnior, A.N. & Oliveira, M.G. (2009) Effect of titanium surface roughness on human bone marrow cell proliferation and differentiation: an experimental study. *Acta Cirurgica Brasileira* **24**: 200-205.
47. Singh, RG. (2012) A comparative analysis of sandblasted and acid etched and polished titanium surface on enhancement of osteogenic potential: An in vitro study. *Journal Dental Implants* **2**: 15-18.
48. Togashi, A.Y., Cirano, F.R., Marques, M.M., Pustiglioni, F.E., Lang, N.P. & Lima, L.A. (2009) Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7) on the viability, proliferation and differentiation of osteoblast-like cells cultured on a chemically modified titanium surface. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 452-457.
49. Trisi, P., Lazzara, R., Rebaudi, A., Rao, W., Testori, T. & Porter, S.S. (2003) Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. *Journal of Periodontology* **74**: 945-956.

50. Wall, I., Donos, N., Carlqvist, K., Jones, F. & Brett P. (2009) Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro. *Bone* **45**: 17-26.
51. Zhao, G., Zinger, O., Schwartz, Z., Wieland, M., Landolt, D. & Boyan, B.D. (2006) Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 258-264.
52. Wennerberg, A., Albrektsson, T. (2009) Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 172-184.

6. Referências

1. Abrahamsson I, Berglundh T, Linder E, Lang NP, Lindhe J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(4):381-92.
2. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981;10(6):387-416.
3. Alves SF, Wassall T. In vitro evaluation of osteoblastic cell adhesion on machined osseointegrated implants. *Braz Oral Res.* 2009;23(2):131-6.
4. Bornstein MM, Schmid B, Belser UC, Lussi A, Buser D. Early loading of non-submerged titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface. 5-year results of a prospective study in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(6):631-8.
5. Bornstein MM, Valderrama P, Jones AA, Wilson TG, Seibl R, Cochran DL. Bone apposition around two different sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces: a histomorphometric study in canine mandibles. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(3):233-41.
6. Bosshardt DD, Salvi GE, Huynh-Ba G, Ivanovski S, Donos N, Lang NP. The role of bone debris in early healing adjacent to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in man. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(4):357-64.
7. Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992;7(3):302-10.
8. Brånemark R, Brånemark PI, Rydevik B, Myers RR. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. *J Rehabil Res Dev.* 2001;38(2):175-81.
9. Brunette DM. The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1988;3(4):231-46.
10. Bryant SR, Zarb GA. Outcomes of implant prosthodontic treatment in older adults. *J Can Dent Assoc.* 2002;68(2):97-102.
11. Buser D, Brogini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res.* 2004;83(7):529-33.
12. Buser D, Nydegger T, Hirt HP, Cochran DL, Nolte LP. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998;13(5):611-9.

13. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res.* 1991;25(7):889-902.
14. Calvo-Guirado JL, Ortiz-Ruiz AJ, Negri B, López-Marí L, Rodríguez-Barba C, Schlottig F. Histological and histomorphometric evaluation of immediate implant placement on a dog model with a new implant surface treatment. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(3):308-15.
15. Carneiro-Campos LE, Fernandes CP, Balduino A, Leite E, Duarte ME, Leitão M. The effect of titanium topography features on mesenchymal human stromal cells' adhesion. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(2):250-4.
16. Celletti R, Marinho VC, Traini T, Orsini G, Bracchetti G, Perrotti V, Piattelli A. Bone contact around osseointegrated implants: a histologic study of acid-etched and machined surfaces. *J Long Term Eff Med Implants.* 2006;16(2):131-43.
17. Chen WC, Chen YS, Ko CL, Lin Y, Kuo TH, Kuo HN. Interaction of progenitor bone cells with different surface modifications of titanium implant. *Materials Science Engineering C: Material for Biological Applications.* 2014;1(37):305-13.
18. Conserva E, Lanuti A, Menini M. Cell behavior related to implant surfaces with different microstructure and chemical composition: an in vitro analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010;25(6):1099-107.
19. Gehrke SA, Zizzari VL, Iaculli F, Mortellaro C, Tetè S, Piattelli A. Relationship between the surface energy and the histologic results of different titanium surfaces. *J Craniofac Surg.* 2014;25(3):863-7.
20. Gil F, Manzanares N, Badet A, Aparicio C, Ginebra M. Biomimetic treatment on dental implants for short-term bone regeneration. *Clin Oral Investig.* 2014;18(1):59-66.
21. Ivanovski S, Hamlet S, Salvi GE, Huynh-Ba G, Bosshardt DD, Lang NP, et al. Transcriptional profiling of osseointegration in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(4):373–81.
22. Klein MO, Bijelic A, Toyoshima T, Gotz H, von Koppenfels RL, Al-Nawas B, et al. Long-term response of steogenic cells on micron and submicron scale-structured hydrophilic titanium surfaces: sequence of cell proliferation and cell differentiation. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(6):642-9.
23. Klinger A, Tadir A, Halabi A, Shapira L. The effect of surface processing of titanium implants on the behavior of human osteoblast-like saos-2 cells. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2011;13(1):64-70.
24. Lai HC, Zhuang LF, Zhang ZY, Wieland M, Liu X. Bone apposition around two different sandblasted, large-grit and acid-etched implant surfaces at sites with

- coronal circumferential defects: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(3):247-53.
25. Lang NP, Salvi GE, Huynh-Ba G, Ivanovski S, Donos N, Bosshardt DD. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(4):349-56.
 26. Mamalis AA, Silvestros SS. Analysis of osteoblastic gene expression in the early human mesenchymal cell response to a chemically modified implant surface: an in vitro study. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(5):530-7.
 27. Marinucci L, Balloni S, Becchetti E, Belcastro S, Guerra M, Calvitti M, et al. Effect of titanium surface roughness on human osteoblast proliferation and gene expression in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006;21(5):719-25.
 28. Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(6):650-6.
 29. Morra M, Cassinelli C, Bruzzone G, Carpi A, Di Santi G, Giardino R, et al. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 1. surface analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(1):40-5.
 30. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55–63.
 31. Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez BS, Arvidson K. Determining optimal surface roughness of TiO(2) blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Implants Res.* 2001;12(5):515–25.
 32. Nishimoto, S.K., Nishimoto, Park SW, Lee KM, Kim HS, Koh JT, et al. (2008) Yongxing L. & Yunzhi Y. The effect of titanium surface roughening on protein absorption, cell attachment, and cell spreading. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008; 23(4): 675-80.
 33. Novaes AB, Jr de Souza SL, de Barros RR, Pereira KK, Iezzi G, Piattelli A. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J.* 2010;21(6):471-81.
 34. Orsini G, Assenza B, Scarano A, Piattelli M, Piattelli A. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000;15(6):779-84.
 35. Osathanon T, Bessinyowong K, Arksornnukit M, Takahashi H, Pavasant P. Human osteoblast-like cell spreading and proliferation on Ti-6Al-7Nb surfaces of varying roughness. *J Oral Sci.* 2011;53(1):23-30.

36. Palmquist A, Omar OM, Esposito M, Lausmaa J, Thomsen P. Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome. *J R Soc Interface*. 2010;7(5):515-27.
37. Park JW, Kim YJ, Jang JH. Enhanced osteoblast response to hydrophilic strontium and/or phosphate ions-incorporated titanium oxide surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(4):398-408.
38. Passeri G, Cacchioli A, Ravanetti F, Galli C, Elezi E, Macaluso GM. Adhesion pattern and growth of primary human osteoblastic cells on five commercially available titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(7):756-65.
39. Perrin D, Szmukler-Moncler S, Echikou C, Pointaire P, Bernard JP. Bone response to alteration of surface topography and surface composition of sandblasted and acid etched (SLA) implants. *Clin Oral Implants Res*. 2002;13(5):465-9.
40. Protivínský J, Appleford M, Strnad J, Helebrant A, Ong JL. Effect of chemically modified titanium surfaces on protein adsorption and osteoblast precursor cell behavior. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;22(4):542-50.
41. Rupp F, Sheideler L, Eichler M, Geis-Gerstorfer, J. Wetting behavior of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011;26(6):1256-66.
42. Rupp F, Gittens RA, Scheideler L, Marmur A, Boyan BD, Schwartz Z, et al. A review on the wettability of dental implant surfaces I: theoretical and experimental aspects. *Acta Biomater*. 2014;10(7):2894-906.
43. Sammons RL, Lumbikanonda N, Gross M, Cantzler P. Comparison of osteoblast spreading on microstructured dental implant surfaces and cell behaviour in an explant model of osseointegration. A scanning microscopic study. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16(6):657-66.
44. Schroeder A, van der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg*. 1981;9(1):15-25.
45. Schwartz Z, Lohmann CH, Oefinger J, Bonewald LF, Dean DD, Boyan BD. Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv Dent Res*. 1999;13(1):38-48.
46. Silva TS, Machado DC, Viezzer C, Silva Júnior AN, Oliveira MG. Effect of titanium surface roughness on human bone marrow cell proliferation and differentiation: an experimental study. *Acta Cir Bras*. 2009;24(3):200-5.
47. Singh RG. A comparative analysis of sandblasted and acid etched and polished titanium surface on enhancement of osteogenic potential: An in vitro study. *J Dental Implants*. 2012;2(1):15-18.

48. Stanford CM. Surface modification of biomedical and dental implants and the processes of inflammation, wound healing and bone formation. *Int J Mol Sci.* 2010;11(1):354-69.
49. Togashi AY, Cirano FR, Marques MM, Pustiglioni FE, Lang NP, Lima LA. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7) on the viability, proliferation and differentiation of osteoblast-like cells cultured on a chemically modified titanium surface. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(5):452-7.
50. Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, Rao W, Testori T, Porter SS. Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. *J Periodontol.* 2003;74(7):945-56.
51. Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danielli S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Implants Res.* 1998;9(1):11-9.
52. Zhao G, Zinger O, Schwartz Z, Wieland M, Landolt D, Boyan BD. Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(3):258-64.

7. Apêndice

7.1 Artigo 2

Artigo elaborado segundo as normas da revista Journal of Oral Implantology.

Instalação de Implantes Inclinados como Estratégia Compensatória em Maloclusão de Classe III Esquelética e Reconstrução Óssea Maxilar com rhBMP-2 para Reabilitação Protética: Relato de Caso Clínico.

Kely Cristina de Moraes¹, Alberto Costa Gurgel¹, Ivete Aparecida Mathias Sartori², Marcela Claudino³.

¹ Cirurgião-dentista, Mestrando, Departamento de Pós-graduação, Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico (ILAPEO), rua Jacarezinho 656, Curitiba, Paraná, Brasil.

² Cirurgiã-dentista, Mestre, Doutora e PhD, Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico (ILAPEO), rua Jacarezinho 656, Curitiba, Paraná, Brasil.

³ Cirurgiã-dentista, Mestre e Doutora, Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), rua Carlos Cavalcanti 4748, Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

Autor correspondente: Marcela Claudino

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Carlos Cavalcanti 4748, Ponta Grossa Paraná, Brasil. Telefone: +55 (42) 3220-3000

E-mail: marcelaclaudino@hotmail.com

Resumo

A cirurgia ortognática tem sido indicada para tratamento de discrepâncias ósseas em pacientes adultos. Estas cirurgias envolvem procedimentos cirúrgicos invasivos e morbidade elevada. Pacientes adultos desdentados com má oclusão de Classe III apresentam poucas opções de tratamento, incluindo terapias cirúrgicas e, em casos selecionados, alternativas compensatórias de tratamento. Neste contexto, a instalação de implantes inclinados tem apresentado excelentes resultados, obedecendo limitações ósseas e fisiológicas. Desta forma, muitos pacientes acometidos por esta discrepâncias ósseas não são submetidos à cirurgia ortognática em virtude dos fatores pré, intra e pós-operatório. Sendo assim, os procedimentos compensatórios podem resultar em melhorias nos aspectos estéticos, funcionais, psicológicos e sociais, evitando assim, procedimentos cirúrgicos mais invasivos como as cirurgias ortognática. O objetivo deste artigo é apresentar um caso clínico de reabilitação total abordando a aplicabilidade de implantes inclinados para a compensação esquelética de classe III e reconstrução maxilar com recombinante humano de proteína morfogenética óssea tipo 2 (rhBMP-2) em pacientes parcialmente desdentado com a confecção de prótese protocolo bi-maxilar. Neste caso, a técnica de planejamento reverso foi utilizada visando a obtenção de previsibilidade dos resultados estéticos e funcionais, minimizando tempo cirúrgico e possíveis ajustes na adaptação das próteses sobre implantes. Os resultados obtidos neste estudo demonstram a aplicabilidade e previsibilidade desta técnica. Entretanto, critérios rigorosos de planejamento e execução são de fundamental importância para a obtenção de resultados satisfatórios.

Palavras-chave: Má Oclusão de Angle Classe III, Implantes dentários, Proteínas Morfogenéticas Ósseas, Reabilitação bucal, Prótese dentária fixada por implante.

Abstract

The orthognathic surgery has been indicated for treatment of bone discrepancies in adult patients. These surgeries involve invasive surgical procedures and high morbidity. Adult patients with toothless malocclusion Class III have few treatment options, including surgical therapies and, in selected cases, compensatory treatment alternatives. In this context, the installation of tilted implants have produced excellent results, following bone and physiological limitations. Thus, many patients with this bone discrepancies are not subjected to orthognathic surgery because of pre-, intra- and postoperatively. Thus, the compensation procedure can result in improvements in aesthetic, functional, psychological and social as well avoiding more invasive surgical procedures such as orthognathic surgery. The objective of this paper is to present a case of complete rehabilitation addressing the applicability of tilted implants for skeletal class III compensation and jaw reconstruction with recombinant human bone morphogenetic protein type 2 (rhBMP-2) in partially edentulous patients with the production of prosthesis bi-maxillary protocol. In this case, reverse engineering technique was used in order to obtain predictability of aesthetic and functional results, minimizing surgical time and possible adjustments in the fitting of dentures on implants. The results of this study demonstrate the applicability and predictability of this technique. However, strict criteria for planning and execution are crucial for obtaining satisfactory results.

Keywords: Malocclusion, Angle Class III, Dental Implants, Bone Morphogenetic Proteins, oral rehabilitation, dental prosthesis implant.

Introdução

A má oclusão de classe III esquelética é uma deformidade óssea congênita ou adquirida^{13,22}, sendo que o componente hereditário é o mais prevalente e afetam aproximadamente 20% da população. Diferentes relacionamentos entre as bases ósseas, maxila e mandíbula, podem gerar a classe III esquelética, prognatismo mandibular com

maxila normal, retrognatismo maxilar com mandíbula normal, ou uma combinação de ambas^{7,26}.

Nestes casos, pacientes jovens em fase de crescimento e desenvolvimento craniofacial podem ser tratados com Ortopedia Facial e Ortodontia. Contudo, pacientes adultos que apresentam moderada e grave deformidade devem ser tratados com procedimentos cirúrgicos ou compensatórios, dependendo da gravidade da má oclusão. A cirurgia ortognática é o tratamento utilizado para corrigir deformidades congênicas e adquiridas de má oclusão Classe III esquelética, apresentando como objetivos a melhoria da estética facial, uma boa relação entre as bases ósseas e o estabelecimento da função apropriada^{8,13,22}. As cirurgias ortognáticas envolvem procedimentos invasivos com osteotomias, mobilização, reposicionamento e fixação da maxila e mandíbula, além das complicações pós-cirúrgicas^{7,912,13}, muitos pacientes não são submetidos à cirurgia ortognática em virtude destes fatores.²².

Em pacientes adultos com dentes comprometidos ou desdentados parciais ou totais que apresentam problemas de má oclusão de Classe III, a instalação de implantes dentários inclinados tem sido descrita como opção de tratamento viável, dentro das limitações da técnica. Desta forma, o trauma cirúrgico da cirurgia ortognática é evitado ou minimizado, permitindo a reabilitação com próteses implantossuportadas de forma menos traumática, efetiva, estética e previsível¹⁷.

A literatura²⁷ aponta que o sucesso da instalação de implantes está diretamente relacionada com a posição e inclinação correta do implante, em se tratando do eixo axial, entretanto para uma determinação mais precisa da posição, guias cirúrgicos são utilizados²³.

Além destes fatores, a reabilitação com implantes osseointegrados requer um ambiente ósseo favorável para conferir ao implante estabilidade inicial e a possibilidade de instalar próteses em posições adequadas¹⁰. Entretanto, pacientes desdentados sofrem ao longo dos anos perdas alveolares em altura e espessura, tornando este ambiente desfavorável, necessitando de tratamento para reconstruir a estrutura perdida. Neste contexto, fatores como a reconstrução óssea com recombinante humano da proteína morfogenética óssea do tipo 2 (rhBMP-2) tem sido indicado para reabilitação em pacientes que apresentam alto grau de atrofia óssea^{5,19,25,28,30}. Em 2007, a rhBMP-2 foi disponibilizada para procedimentos referentes à reabilitação oral²⁸. Atualmente, vários estudos abordam a reconstrução dos ossos gnáticos com rhBMP-2 que tem apresentado resultados satisfatórios e previsíveis em levantamento seio maxilar^{5,26}, preenchimento de defeitos ósseos²⁸, regeneração óssea guiada²⁴, aumento ósseo em rebordos alveolares atróficos¹⁹.

Apesar de descrições prévias na literatura, abordagens relacionadas à instalação de implantes inclinados bem como o uso de rhBMP-2 em rebordos atróficos tem despertado interesse na comunidade científica. Desta forma, o objetivo deste estudo é apresentar um caso clínico de uma reabilitação total, abordando a aplicabilidade de implantes inclinados no sentido axial lingual na mandíbula, orientados por guia tomográfico e cirúrgico visando a compensação da discrepância óssea resultante de uma má oclusão de Classe III esquelética e a reconstrução maxilar através de rhBMP-2, para confecção de prótese tipo protocolo bi-maxilar.

Relato de caso

Paciente 50 anos, sexo feminino, apresentando perdas dentárias múltiplas, procurou por tratamento reabilitador no Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico (ILAPEO, Curitiba, Paraná) com queixa principal baseada na estética desfavorável decorrente de má oclusão de Classe III esquelética e perdas dentárias.

Na análise facial, a paciente apresentou padrão de Classe III, com deficiência ântero-posterior no terço médio da face, resultando em perda do suporte labial, ângulo naso-labial diminuído (Figura 1a). O terço médio inferior apresentou-se aumentado com selamento labial forçado e com giro anti-horário da mandíbula, intensificando o aspecto estético desfavorável característico da má oclusão de classe III (Figura 1b).



Figura 1. (a) Análise extra-bucal do perfil facial mostrando a perda de suporte labial e redução no ângulo naso-labial. (b) Observar aspecto extra-bucal frontal e a presença de selamento labial forçado.

A paciente utilizava prótese parcial removível superior mucodentossuportada com severo desgaste incisal, decorrente da mordida em topo com antagonista (Figura 2a,b). A análise intra-bucal revelou a presença de estomatite protética, caracterizada pelo aspecto eritematoso da mucosa resultante dos hábitos de higiene bucal insatisfatórios (Figura 3a). A estomatite protética foi tratada com gel de 20 mg/g de miconazol durante 14 dias, resultando na remissão do quadro clínico. A paciente também foi orientada quanto à higienização da prótese bem como quanto ao hábito de remover a prótese no período noturno.

O exame radiográfico revelou a presença de reabsorção óssea no sentido horizontal e vertical decorrente de perdas múltiplas dentárias na maxila. Na mandíbula, foram observados 8 dentes com próteses do tipo metalocerâmica, doença periodontal em fase avançada com perda de suporte ósseo e múltiplos dentes com tratamentos endodônticos, acompanhados por lesões radiográficas compatíveis com rarefações ósseas periapicais (Figura 4).

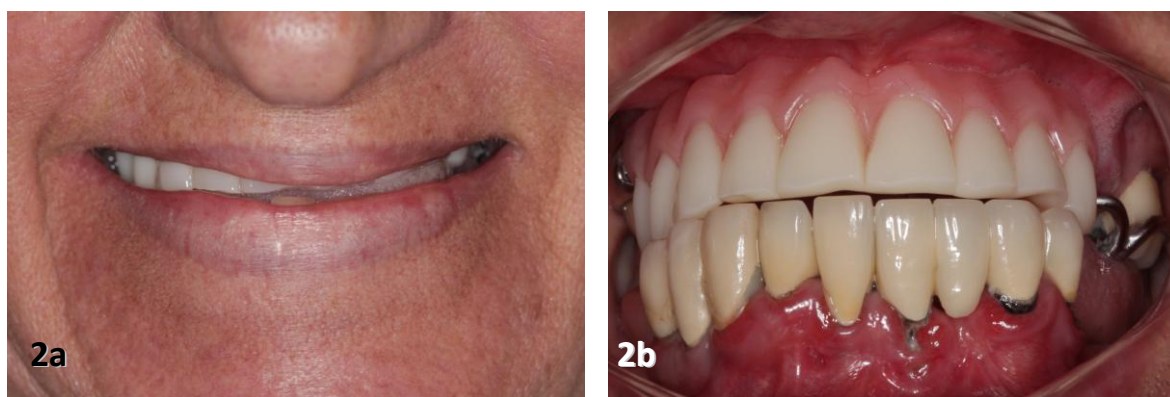


Figura 2. (a) Aspecto extra-bucal do sorriso com prótese. (b) Aspecto intra-bucal revelando de desgastes incisais da prótese decorrente de mordida em topo.



Figura 3. (a) Análise intra-bucal do rebordo superior. Observar o aspecto eritematoso da mucosa em aspecto oclusal. (b) Aspecto vestibular deste rebordo.



Figura 4. Radiografia panorâmica inicial.

A análise cefalométrica revelou um padrão esquelético de Classe III com (ANB – $2,72^\circ$), padrão facial dolicofacial (SN.GoMe $42,46^\circ$), com perfil côncavo (H.NB $1,18^\circ$) e

com inclinação lingual dos incisivos inferiores (IMPA 78,04° e 1.NB 18,28°) e protrusão incisivo inferior (1-NB 5,87mm).

Inicialmente, o planejamento proposto envolveu a exodontia dos dentes inferiores remanescentes bem como a combinação de cirurgia ortognática com recuo mandibular. Na arcada superior, foi proposta a instalação de implantes zigomáticos ou reconstrução da maxila rhBMP-2 para instalação de implantes osseointegrados e reabilitação com prótese do tipo protocolo. Entretanto, devido à alta morbidade, a paciente recusou o plano de tratamento. O segundo plano de tratamento referente ao rebordo mandibular foi baseado na instalação de implantes ósseos inclinados no sentido axial lingual e reconstrução maxilar com rhBMP-2 e reabilitação com prótese do tipo protocolo.

Para a realização do plano de tratamento aceito pela paciente, inicialmente foi realizado exame clínico, radiográfico e fotográfico. O planejamento cirúrgico foi realizado em 3 fases distintas: sendo, inicialmente com instalação dos implantes inclinados axial lingual. Em seguida, o plano de tratamento abordou a reconstrução da maxila com rhBMP-2 e finalmente instalação dos implantes nesta região. O planejamento protético foi realizado pela técnica do planejamento reverso, visando otimizar os resultados. Em uma primeira fase, foi planejado prótese mucodentossuportada em maxila e prótese protocolo implantossuportada na mandíbula, e após a reconstrução maxilar com rhBMP-2, a confecção da prótese protocolo.

A execução do plano de tratamento iniciou-se com a moldagem anatômica pela técnica híbrida de moldagem, utilizando silicone denso e refinamento com alginato para obtenção dos modelos de estudo. Em seguida, foram confeccionadas moldeiras individuais com rodets de cera para registro das dimensões vertical de oclusão (DVO) e relação cêntrica (RC). A Técnica de Willis associada a testes fonéticos, análise facial e técnica da

deglutição foram realizados para mensurar as relações maxilofaciais. Na sequência, foi realizada uma montagem em articulador semi-ajustável bem como registros no arco facial. A montagem dos dentes seguiu o modelo pré-determinado para paciente compensando o tamanho da mandíbula em relação a maxila em aspecto frontal (Figura 5a) e lateral (Figura 5b). Na prova dos dentes, foi possível observar melhorias nas relações horizontais, altura facial, ângulos naso-labial e na projeção dos tecido moles, em repouso (Figura 6a) e no sorriso (Figura 6b). Após a prova de dentes e verificação da relação intermaxilar, espaço funcional livre e a estética, a prótese foi duplicada para confecção do guia multifuncional. Foi confeccionado um guia radiográfico e instalado na prótese superior e solicitado uma telerradiografia de perfil para avaliação da posição da prótese total em relação a região mental para planejamento da instalação dos implantes inclinados axial lingual inferiores.

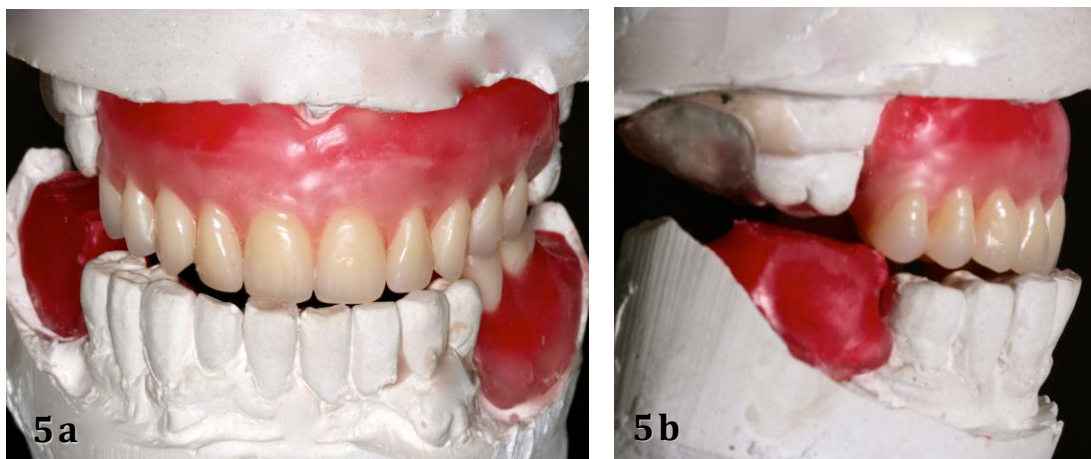


Figura 5. (a) Montagem dos dentes compensando discrepâncias ósseas, aspecto frontal. (b) Aspecto lateral.



Figura 6. (a) Avaliação do perfil facial durante a prova dos dentes em repouso. (b) Avaliação do sorriso, revelando uma estética facial mais favorável.

A primeira fase do procedimento cirúrgico, procedeu-se com a instalação de implantes inclinados axiais para lingual. A cirurgia foi realizada em ambiente ambulatorial com anestesia local associada a sedação endovenosa, com incisão linear sobre o rebordo, intrasulcular na região dentada e relaxantes nas duas regiões distais, após o forame mental. Em seguida, procedeu-se o descolamento mucoperiosteal, remoção dos remanescentes dentários, regularização do rebordo alveolar com brocas multilaminadas para peça de mão, adaptação do guia multifuncional e instalação dos 5 implantes interforaminais (Figura 7). Foram utilizados implantes com conexão do tipo cone Morse (Titamax Cortical, Neodent, Curitiba, Brasil), nas regiões numeradas de 1 a 5 da esquerda para direita com dimensão de 3,5 mm diâmetro e 13 mm de comprimento. Todos os

implantes instalados atingiram torques de inserção acima de 60 Ncm, compatíveis com a técnica da carga imediata. Os implantes foram inclinados obedecendo parâmetros de espessura óssea e relação com o plano oclusal determinado pelo posicionamento da prótese superior analisada na telerradiografia de perfil. Após a instalação dos implantes, seguiu-se a seleção dos componentes protéticos, minipilares cônicos 3,5 mm (Neodent), nas regiões 2 e 3 componentes retos e angulados em 17° nas região 01, 04 e 05 compensando a inclinação dos implantes para a confecção de uma barra protética com menor largura. Em seguida, procedeu-se a moldagem de transferência dos minipilares e registro oclusal para acrilização da prótese protocolo e prótese total superior (Figura 8). As próteses foram instaladas 2 dias após a inserção dos implantes (Figura 9), sem intercorrências nos procedimentos cirúrgicos e protéticos, e a paciente relatou estar satisfeita com a estética alcançada, estabilidade da reabilitação e conforto mastigatório (Figura 10a e 10b).

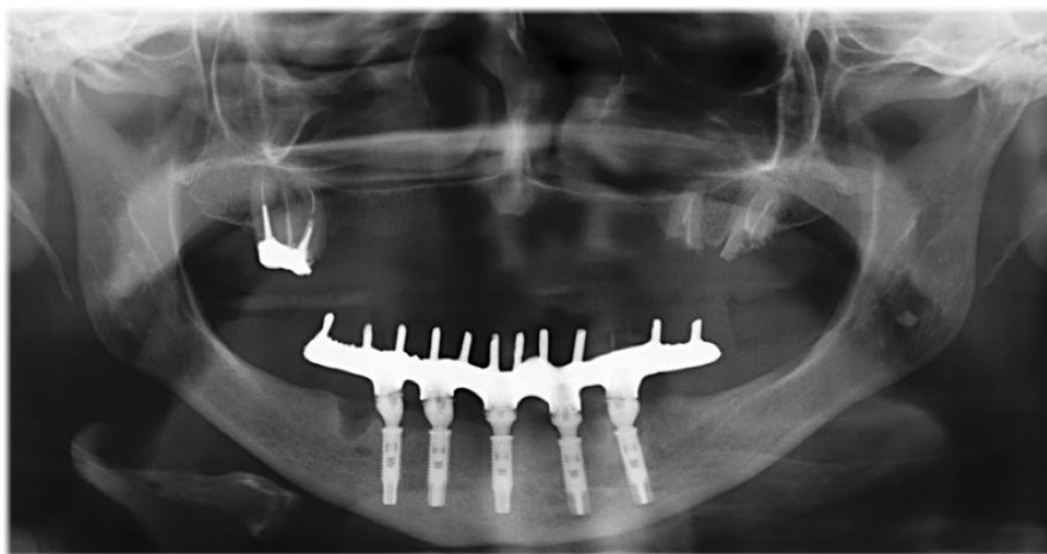


Figura 7. Radiografia panorâmica após a instalação dos implantes inferiores.



Figura 8. Moldagem de transferência e registro interoclusal.



Figura 9. Aspecto clínico da instalação da prótese do tipo protocolo inferior e prótese mucodentossuportada superior.



Figura 10. (a) Aspecto clínico do perfil facial após a reabilitação protética em posição lateral. (b) Frontal.

Na segunda fase, os procedimentos cirúrgicos foram realizados em ambiente hospitalar sob anestesia geral. A cirurgia iniciou-se com incisão, descolamento mucoperiosteal, esvaziamento do canal do incisivo e remoção dos elementos remanescentes dentários. O exame tomográfico (Figura 11) e clínico intra-bucal (Figura 12a e 12b) mostrou uma variação anatômica incomum das fossas nasais no sentido lateral promovendo comunicação com os seios maxilares que se estendia até os segundos molares superiores. Assim, optou-se por realizar a elevação das fossas nasais com preenchimento da cavidade com osso xenógeno liofilizado (BioOss, Geistlich Biomaterials, Osteohelth, Switzerland) associado a rhBMP-2 (INFUSE® Bone Graft, Medtronic Spinal and Biologics, Memphis, TN) (figura 13a), fixados com malha de titânio e parafuso de enxerto 1,2 mm diâmetro e 10 mm de comprimento (Neodent, Curitiba, Brasil) (Figura 13b) e

revestido com membrana de colágeno reabsorvível (Bio-guide, Geistlich Biomaterial, Osteohelth, Switzerland). A prótese mucodentossuportada superior foi aliviada, tornando-se uma prótese total (PT), sendo reembasada com material resiliente (Bosworth Trusoft, Illinois, USA) e instalada. O exame radiográfico ilustra o arcabouço com malha de titânio (Figura 14) e evidencia a dimensão da reconstrução, sendo assim, estipulou-se um período de 8 meses para instalação dos implantes superiores.

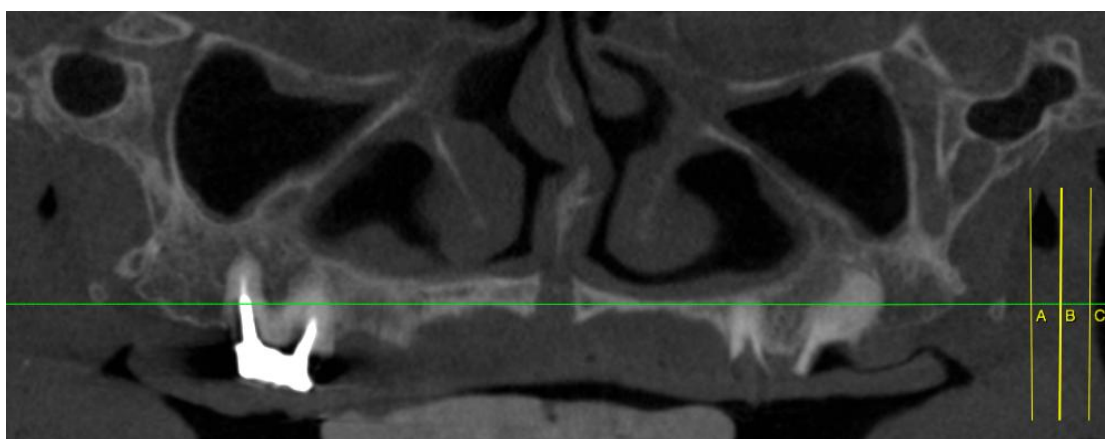


Figura 11. Aspecto tomográfico da maxila evidenciando a variação anatômica das fossas nasais em comunicação com seio maxilar.

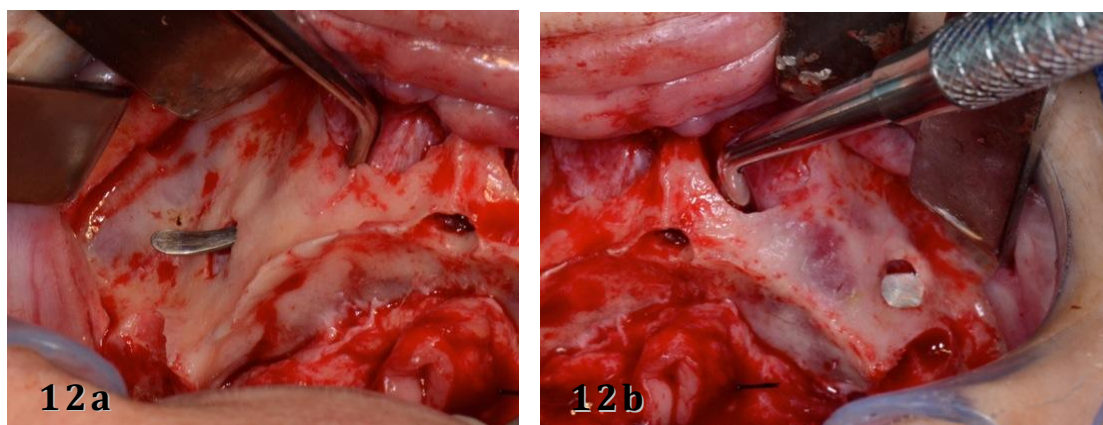


Figura 12. (a) Aspecto clínico da lateral direita. (b) Lateral esquerda.

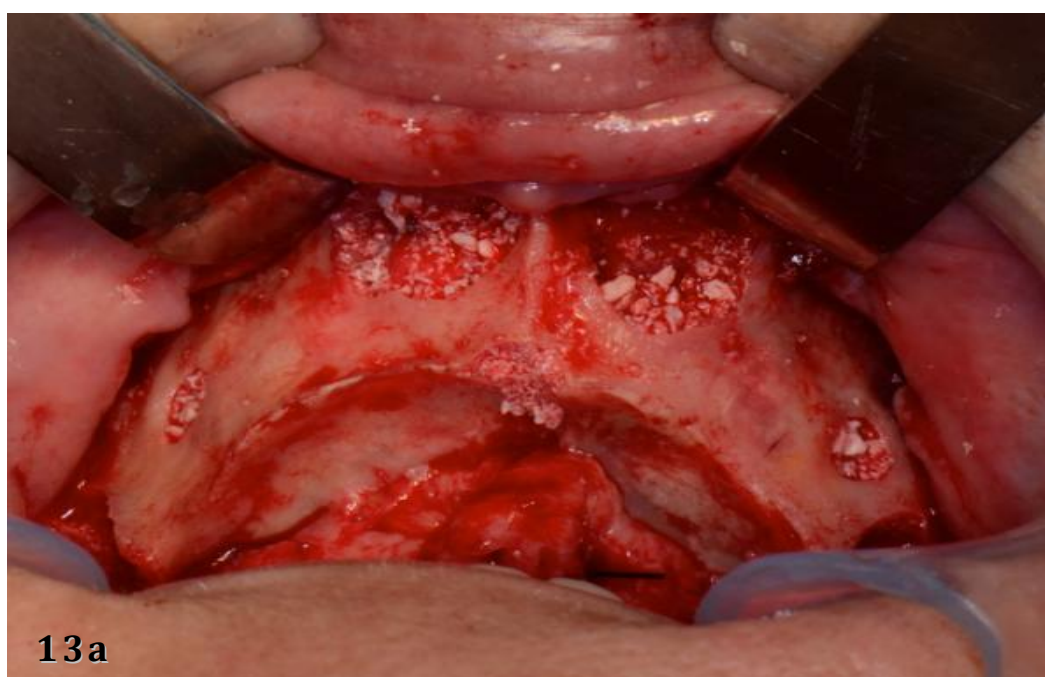


Figura 13. (a) Aspecto clínico do preenchimento da cavidade com osso xenógeno liofilizado associado a rhBMP-2.

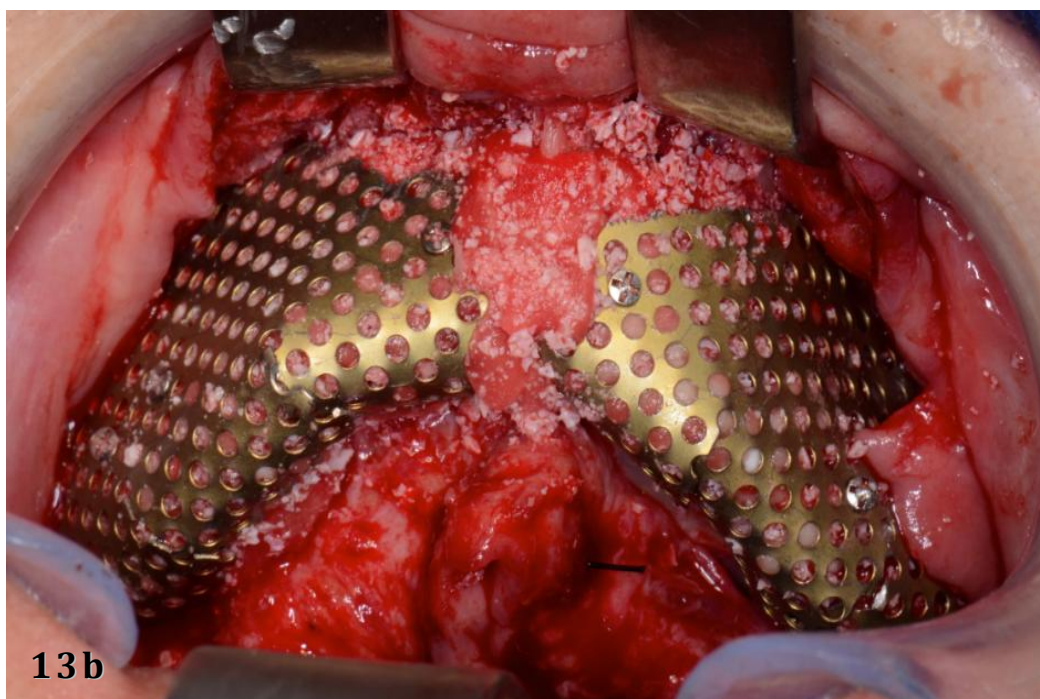


Figura 13. (b) Aspecto clínico do arcabouço com malha de titânio fixados com parafuso de enxerto.



Figura 13. (c) Aspecto clínico após o posicionamento da membrana reabsorvível.

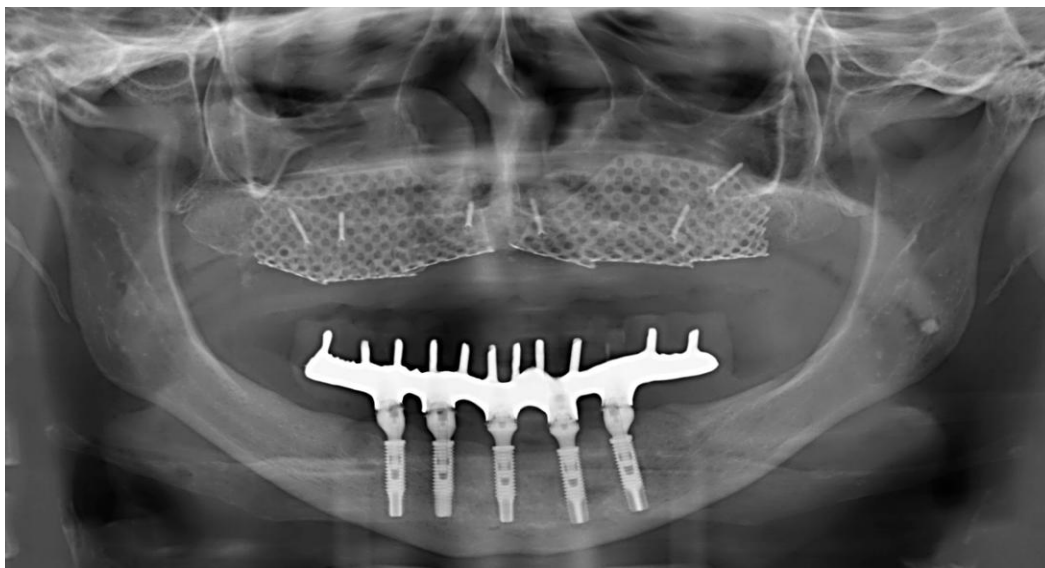


Figura 14. Aspecto radiográfico panorâmico ilustrando o arcabouço da reconstrução da maxila com malha de titânio.

Finalmente, na terceira fase procedeu-se a instalação de 8 implantes na maxila, sendo conexão do tipo cone Morse (Drive Acqua, Neodent, Curitiba, Brasil) nas regiões numeradas de 1 a 8 da esquerda para direita com dimensão de 3,5 mm de diâmetro e 13 mm de comprimento. Todos os implantes instalados atingiram torques de inserção acima de 30 Ncm. Entretanto, por se tratar de uma extensa reconstrução na região maxilar, optou-se por esperar um período de 6 meses para osseointegração. O exame radiográfico revelou ausência de radiolucidez peri-implantar em todos os implantes instalados na mandíbula, sugerindo que a osseointegração ocorreu dentro dos padrões de normalidade após 20 meses, podemos observar também a formação óssea sobre o rebordo alveolar da maxila em 8 meses e a instalação dos implantes maxilar (Figura 15). Após período de 20 meses para mandíbula e 8 meses para maxila, foi realizado uma análise cefalométrica com sobreposição das imagens iniciais e finais do tratamento para comparar as mudanças alcançadas (Figura 16). Observa-se na região maxilar um maior volume ósseo com a

reconstrução com rhBMP-2, e na região mandibular a diferença entre a posição inicial e final em resultado da regularização do rebordo ósseo (altura) e a instalação dos implantes inclinados (lingualização). A análise cefalométrica (Tabela 1) revelou uma diferença entre o posicionamento inicial dentário (1-NB 5,87 mm) e final dos implantes (1-NB 2,79 mm), resultando em um posicionamento mais retruído dos implantes em 3,08 mm em relação a base apical. A mensuração angular inicial foi de 1.NB 18,28 enquanto a mensuração final foi de 1.NB 10,33°, finalizando uma inclinação de 7,95°. Em relação ao IMPA, os valores iniciais foram de 78,04° e os valores finais foram de IMPA 70,46°. No acompanhamento clínico e radiográfico após 20 meses, foi observada estabilidade funcional da prótese protocolo inferior e PT superior com ausência de desgastes oclusais. Assim sendo, os procedimentos realizados neste caso clínico revelam resultados clínicos favoráveis, caracterizados pela correção das discrepâncias sem a necessidade de cirurgias ortognáticas. A prótese protocolo superior foi confeccionada após 6 meses à instalação dos implantes superiores. Os resultados obtidos nesta reabilitação revelam um perfil compensatório aceitável e estável nos aspectos estéticos, oclusais e funcionais (Figura 17) .

Tabela 1. Comparação da Análise Cefalométrica inicial e final.

	Inicial	Final	Padrão
SNA	75,06 gr	76,83 gr	82,00
SNB	77,78 gr	77,78 gr	80,00
ANB	-2,72 gr	-1,05 gr	2
1.NB	18,28 ⁰	10,33 ⁰	25 ⁰
1-NB	5,87	2,79	4,0
SNGoGn	42,46	41,76	32
IMPA	78,04 ⁰	70,46 ⁰	87 ⁰

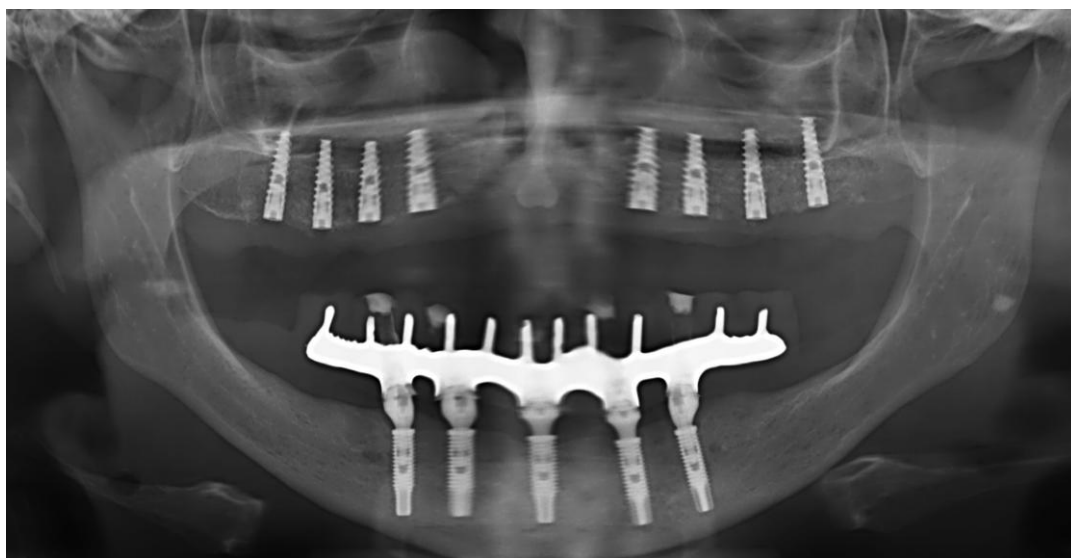


Figura 15. Aspecto radiográfico panorâmico ilustrando acompanhamento de 20 meses após instalação de implantes na região mandibular, e imediatamente após a instalação dos implantes na região maxilar.

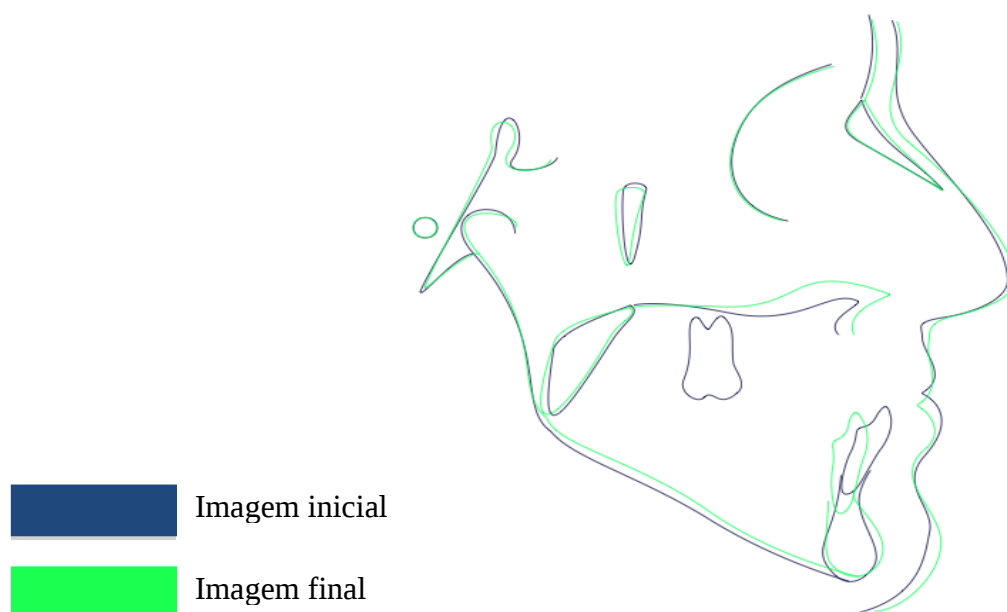


Figura 16. Aspectos cefalométricos em sobreposição, evidenciando as diferenças após reconstrução com rhBMP-2 e instalação dos implantes inclinados.



Figura 17. Aspecto clínico da reabilitação final: (a) Aspecto Intra-bucal em Oclusão.



Figura 17. (b) Aspecto frontal.



Figura 17. (c) Perfil.

Discussão

O tratamento de paciente adulto com má oclusão esquelética de Classe III é um grande desafio e apresenta opções de tratamento que incluem a cirurgia ortognática e a confecção de próteses mucossuportadas e implantossuportada^{8,11,13,22}. Entretanto, é importante que as discrepâncias ósseas sejam compensadas para a confecção de próteses com oclusão adequada, evitando a instabilidade⁶.

A reabilitação protética com instalação de implantes osseointegráveis promove, além da estabilidade das próteses, a possibilidade de reabilitar pacientes, compensando discrepâncias e evitando cirurgia ortognática⁶. Neste contexto, o planejamento reverso permite prever os resultados estético e funcionais e planejar o posicionamento dos implantes buscando o melhor relacionamento entre as bases ósseas.

A literatura²⁰ enfatiza que os implantes devem ser instalados perpendicular ao plano oclusal. Entretanto, em pacientes que não apresentam condições favoráveis anatomicamente para a instalação perpendicular, a inclinação dos implantes pode ser uma alternativa viável na reabilitação¹⁶. Os mecanismos de compensação podem ser fatores de grande relevância na reabilitação protética de sucesso em pacientes com diferentes classes esqueléticas, que possibilitam a instalação de próteses que permitam estabilidade, função, estética e a satisfação do paciente¹⁵.

Corroborando com outros autores^{15,20}, a instalação de implantes com inclinação axial lingual foi utilizado neste caso com objetivo de compensar a discrepância esquelética de classe III com prognatismo mandibular. A execução do planejamento reverso bem como a confecção do guia cirúrgico foram de grande relevância no planejamento cirúrgico para definição do posicionamento dos implantes e na confecção de prótese. Além da instalação de implantes inclinados, foi utilizado o protocolo de carga imediata, o qual vem sendo frequentemente utilizado^{18,24} com o objetivo de estimular mecanicamente o tecido ósseo subjacente bem como reduzir o número de intervenções cirúrgicas e protéticas.

A instalação de implantes inclinados associada a técnica de carga imediata tem sido proposta para a reabilitação de maxilas atróficas, apresentando elevado índice de sucesso e manutenção do níveis de osso marginal e gengival^{4,9,15,16,29}. Por outro lado, outros autores^{2,10,14,21,29} não encontraram diferenças nos resultados clínicos e radiográficos entre implantes inclinados e axiais. Vale ressaltar que estes estudos referem-se a implantes inclinados no sentido mesio-distal, sendo que a inclinação de implantes no sentido vestibulo-lingual não foi encontrada nesta revisão. Este caso clínico com acompanhamento de 20 meses apresenta resultados clínicos favoráveis referentes aos níveis ósseos e gengivais.

Neste estudo, a paciente apresentava prótese superior removível com desgastes excessivos devido a mordida em topo com próteses fixas metalocerâmicas inferiores. Além disso, todos os dentes inferiores apresentavam tratamento endodôntico e as rarefações periapicais persistentes, sugerindo que tais complicações poderiam estar associadas a má oclusão em topo. Além disso, a paciente apresentava atrofia óssea maxilar com uma variação anatômica incomum das fossas nasais no sentido lateral promovendo comunicação com os seios maxilares que se estendia até os segundos molares maxilar. Baseada nos resultados favoráveis encontrados na literatura^{5,28,30}, optou-se por realizar a elevação das fossas nasais com preenchimento da cavidade com osso xenógeno liofilizado associado a rhBMP-2. Em um relato de caso²⁵, a aplicabilidade da rhBMP-2 associado com osso autógeno, esponja absorvível de colágeno e plasma rico em plaquetas em grandes defeitos alveolares foi relatada. Após 1 ano de acompanhamento, os tecidos moles apresentaram-se saudáveis, o exame tomográfico revelou aumento ósseo peri-implantar, rebordo alveolar normal com aumento da densidade óssea. Outros autores¹⁹, apresentaram um caso clínico de uma paciente com severa atrofia maxilar recebendo tratamento com rhBMP-2 associado a osso xenógeno liofilizado após período de 6 meses, observou-se considerável formação óssea permitindo a instalação de implantes. O caso teve acompanhamento de 3 anos e apresentou excelentes resultados clínicos.

No entanto, existe na literatura uma controvérsia quanto ao melhor material para reconstrução óssea. O osso autógeno é recomendado como padrão ouro para reconstruções de defeitos alveolares²⁵, entretanto, é uma alternativa de tratamento que apresenta grande morbidade⁵. Outros substitutos ósseos como rhBMP-2 tem sido indicado, apresentando resultados favoráveis^{5,19,28,30}. Neste relato de caso, a opção do uso de rhBMP-2 foi baseada

na redução de morbidade, uma vez que não há necessidade de acessar qualquer sítio doador.

A análise cefalométrica após compensação com os implantes inclinados para lingual e reconstrução com rh-BMP2 revelou uma diferença entre o posicionamento inicial dentário (1-NB 5,87 mm) e final dos implantes (1-NB 2,79 mm), resultando em um posicionamento mais retruído dos implantes em 3,08 mm em relação a base apical. A mensuração angular inicial foi de 1.NB 18,28 enquanto a mensuração final foi de 1.NB 10,33°, finalizando uma inclinação de 7,95°. Em relação ao IMPA, os valores iniciais foram de 78,04° e os valores finais foram de IMPA 70,46°. Esta compensação no posicionamento dos dentes em relação aos implantes inclinados permitiu a confecção de próteses com maior estabilidade, ou seja próteses com overjet e overbite dentro dos limites padrão, evitando assim uma oclusão com mordida em topo a topo característico de pacientes com má oclusão esquelética de classe III. Este posicionamento estratégico também permitiu a confecção de uma barra protética com menor largura, o que favorece a higienização, acomodação do músculo da língua, dicção e conforto, associado a um perfil estético mais favorável.

Conclusão

Com base na literatura e nos resultados obtidos neste caso clínico, pode-se observar que a reconstrução com rhBMP-2 e a instalação de implantes inclinados é uma técnica que apresenta aplicabilidade e previsibilidade para a reabilitação de pacientes com atrofia óssea e necessidade de compensação esquelética má oclusões de classe III. Entretanto, para

obtenção de resultados clinicamente satisfatórios, é de fundamental importância que critérios de planejamento e execução sejam rigorosamente analisados. E ainda, estudos de maior amostragem e períodos de acompanhamento longos devem ser realizados para comprovar que estas estratégias de tratamento podem ser bem indicados para reabilitação de pacientes atróficos e com necessidade de compensação de discrepâncias ósseas para reabilitação protética.

Abreviaturas

DVO: dimensão vertical de oclusão

PT: prótese total

rh-BMP2: proteína morfogenética recombinante humana

ANB: relação maxila-mandíbula no sentido ântero-posterior.

SN.GoMe: padrão de crescimento facial

HNB: perfil mole com estruturas esqueléticas

1-NB: protrusão do incisivo inferior

IMPA: inclinação axial do longo eixo do incisivo inferior em relação ao plano mandibular

Referências

1. Abrahamson I, Berglundht T, Lindhe J. The mucosal barrier following abutment disconnection. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 1997;24:568-572.
2. Acocella A, Ercoli C, Geminiani A, et al. Clinical evaluation of immediate loading of electroeroded screw-retained titanium fixed prostheses supported by tilted implant: a multicenter retrospective study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012;14e98-e108.

3. Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Branemark PI, Jemt T. A long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1990;5:347-359.
4. Agliardi E, Clericò M, Ciano P, Massironi D. Immediate loading of full-arch fixed prostheses supported by axial and tilted implants for the treatment of edentulous atrophic mandibles. *Quintessence Int.* 2010;41:285-293.
5. Boyne PJ, Marx RE, Nevins M, Triplett G, Lizaro E, Lilly LC, Alder M, Nummikoski P. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1997;17:11-25.
6. Bynum J. Treatment of a Class III Malocclusion. *J Cosmetic Dent.* 2013;29:64-72.
7. Chow LK, Singh B, Ciu WK, Samman N. Prevalence of postoperative complications after orthognathic surgery: a 15-year review. *J Oral Maxillofac Surg.* 65:984-992.
8. Comparin É, Comparin R, Inoue-Comparin E, et al: Correção cirúrgica do padrão III: relato de caso clínico. *Dental Press J Orthod.* 2010;9:93-101.
9. Degidi M, Nardi D, Piattelli A. Immediate loading of the edentulous maxilla with a definitive restoration supported by an intraorally welded titanium bar and tilted implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010;25:1175-1182.
10. Del Fabbro M, Ceresoli V. The fate of marginal bone around axial vs. tilted implants: A systematic review. *Eur Oral Implantol.* 2014;7:171-189.
11. Hotta Y. Use of cephalometric analysis for implant placement in a patient with an edentulous maxilla with a severe Class III intermaxillary relationship. *J Oral Implantol.* 2004;30:7-13.
12. Hueto-Madrid JA, Gutierrez-Santamaria J. Complicaciones quirúrgicas de la cirugía ortognática: presentación de tres casos y revisión de la literatura. *Rev Esp Cirurg Oral y Maxilofac.* 2012;34(2):56-74.
13. Kim SG, Park SS. Incidence of complications and problems related to orthognathic surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:2438-2444.
14. Koutouzis T, Wennström JL. Bone level changes at axial- and non-axial-positioned implants supporting fixed partial dentures. A 5-year retrospective longitudinal study. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18:585-590.
15. Krennmair G, Fürhauser R, Krainhöfner M, Weinländer M, Piehslinger E. Clinical outcome and prosthodontic compensation of tilted interforaminal implants for mandibular overdentures. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20:923-929.

16. Kim KS, Kim YL, Bae JM, Cho HW. Biomechanical comparison of axial and tilted implants for mandibular full-arch fixed prostheses. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011;26:976-984.
17. Leahy FM. Rehabilitation with total fixed prosthesis on unfavorably positioned implants in maxilla: case report. *Dental Press Implantol.* 2012;6:44-52.
18. Lozada JL, Ardah AJ, Rungcharassaeng K, Kan JY, Kleinman A. Immediate functional load of mandibular implant overdentures: a surgical and prosthodontic rationale of 2 implant modalities. *J Oral implantol.* 2004;30:297-306.
19. Luiz J, Padovan LE, Claudino M. recombinant human bone morphogenetic protein 2 in augmentation procedures: case reports. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014;29:1198-1203.
20. Meriske-Stern R. Forces on implants supporting overdentures: a preliminary study of morphologic and cephalometric considerations. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1993;8:254-263.
21. Naini RB, Nokar S, Borghei H, Alikhasi M. Tilted or parallel implant placement in the completely edentulous mandible. A three-dimensional finite element analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011;26:776-781.
22. Panula K, Finne K, Oikarinen K. Incidence of complications and problems related to orthognathic surgery: a review of 655 patients. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001;59:1128-1136.
23. Saadoun AP, LeGall M. Implant positioning for periodontal, functional, and aesthetic results. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1992;4:43-54.
24. Schnitman PA, Wöhrle PS, Rubenstein JE, Da Silva JD, Wang NH. Ten-year results for Brånemark implants immediately loaded with fixed prostheses at implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997;12:495-503.
25. Sclar AG, Best SP. The combined use of rhbmp-2/acs, autogenous bone graft, a bovine bone mineral biomaterial, platelet-rich plasma, and guided bone regeneration at nonsubmerged implant placement for supracrestal bone augmentation. A case report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013;28:272-276.
26. Spalj S, Mestrovic S, Lapter Varga M, Slaj M. Skeletal components of class III malocclusions and compensation mechanisms. *J Oral Rehabil.* 2008;35:629-637.
27. Sykaras N, Woody RD. Conversion of na implant radiographic template into a surgical template. *J Prosthodont.* 2001;10:108-112.
28. Tarnow DP, Wallace SS, Testori T, Froum SJ, Motroni A, Prasad HS. Maxillary sinus augmentation using recombinant bone morphogenetic protein-2/acellular collagen sponge in combination with a mineralized bone replacement graft: a report of three cases. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2010; 30(2):138-149.

29. Testori T, Del Fabbro M, Capelli M, Zuffetti F, Francetti L, Weinstein RL. Immediate occlusal loading and tilted implants for the rehabilitation of the atrophic edentulous maxilla: 1-year interim results of a multicenter prospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19:227-232.
30. Wang J, Zheng Y, Zhao J, et al. Low-dose rh BMP2/7 heterodimer to reconstruct peri-implant bone defects: a micro- CT evaluation. *J Clin Periodontol.* 2012;39:98-105.

7.2 Termo de Consentimento

00112

AUTORIZAÇÃO PARA USO DE IMAGEM

Autorizo, gratuita e espontaneamente, a utilização pelo Cirurgião-Dentista e pelo ILAPEO de minhas imagens intra orais e extra orais, assim como modelos e dados relativos ao meu tratamento para as finalidades:

Publicação em revista científica; Pesquisa científica; Exposição em congressos científicos e Exposição em aulas e seminários com finalidade de aprendizado.

A utilização deste material não gera nenhum compromisso de ressarcimento, a qualquer preceito, por parte do Cirurgião-Dentista.

Curitiba, 10 de SETEMBRO de 20 10.

Assinatura do Paciente ou Responsável: _____ RG: _____

Assinatura do Cirurgião-Dentista: _____ CRO: _____

8. Anexos

8.1 Carta de Aprovação do Comitê de Ética

 UEPG UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ	Folha: 34 Processo: 2661/2013 Órgão: UEPG Data: 24/04/2013 Responsável: ALX PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL
--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 004/2013

Protocolo UEPG – 02661/2013

Título – “Avaliação do comportamento celular na presença de superfícies de titânio submetidas a diferentes tratamentos: análise in vitro”

Interessado – Prof. Dr. Fábio André dos Santos

Data de Entrada – 26/02/2013

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – Validade de dois anos.
26/02/2013 a 25/02/2015

Considerações

Prezado Professor,

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos.
Atenciosamente,

Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.


Professor Dr. Giovanni Marino Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaíras
Porta Grossa – Paraná
Bloco da Retoria - anexo a PROESP
Fone: (042) 3220-3264

8.2- Normas de Publicação

- Normas publicação Artigo 1 - Revista Clinical Oral Implants Research

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1600+0501/homepage/ForAuthors.h](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1600+0501/homepage/ForAuthors.html)
[tml](#)

- Normas publicação Artigo 2 - Revista Journal of Oral Implantology

<http://www.joionline.org/page/authors>