

HEWERSON SANTOS TAVARES

**Estudo *in vitro* da interação de titânio irradiado por feixe de laser
Yb:YAG com e sem recobrimento de apatitas, empregando-se
cultura de células estaminais humanas**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi
Co-orientadora: Prof. Dra. Helena Maria Pires Gaspar Tomás

**Araraquara
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

T231e Tavares, Hewerson Santos
Estudo in vitro da interação de titânio irradiado por feixe de laser Yb:YAG com e sem recobrimento de apatitas, empregando-se cultura de células estaminais humanas / Hewerson Santos Tavares. – Araraquara : [s.n], 2009
57 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Antonio Carlos Guastaldi
Co-orientador: Helena Maria Pires Gaspar Tomas

1. Titânio. 2. Laser. 3. Cultura de células. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara

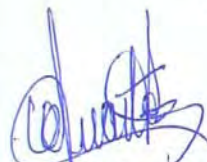
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

HEWERSON SANTOS TAVARES

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Araraquara, 21 de julho de 2009.

BANCA EXAMINADORA



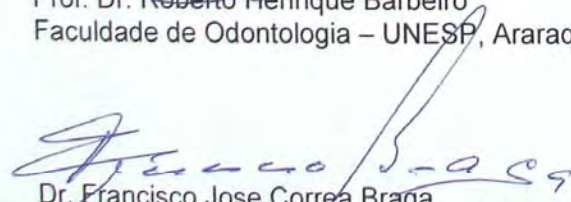
Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Rogério Margonar
Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara



Prof. Dr. Roberto Henrique Barbeiro
Faculdade de Odontologia – UNESP, Araraquara



Dr. Francisco Jose Correa Braga
Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares – IPEN, São Paulo



Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Hewerson Santos Tavares

Filiação: Antonio Tavares da Silva e Maria da Paz dos Santos Silva

Nascimento: 01/01/1974, Brasília DF

RG: 1380532 SSP. DF

CPF: 56448694153

Endereço residencial: Rua Expedicionários do Brasil 1311, Araraquara, SP.

CEP: 14.801 360

Telefone: (16) 3397-2534

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- | | |
|-------------|--|
| 2005 – 2009 | Doutorado em Biotecnologia
Universidade Estadual Paulista – UNESP
Título: Estudo <i>in vitro</i> da interação de titânio irradiado por feixe de laser Yb:YAG com e sem recobrimento de apatitas empregando-se cultura de células estaminais humanas.
Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi
Bolsista: Capes |
| 2001 – 2003 | Mestrado em Medicina, Cirurgia de Cabeça e Pescoço
Hospital Heliópolis - Unidade de Gestão Assistencial 1,
HELIÓPOLIS, São Paulo, Brasil.
Título: Estudo cefalométrico das alterações no perfil facial em pacientes classe III dolicocefálicos submetidos a cirurgia ortognática bimaxilar.
Orientador: Prof. Dr. Abrão Rapoport |
| 1992 – 1996 | Graduação Odontologia Universidade de Uberaba UNIUBE MG |

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Artigos completos em periódicos:

TAVARES, H. S.; FAEDA, R.; GUASTALDI, A.C.; GUASTALDI, F.; MARCANTONIO, Jr E. Study on implants subjected to four different surface treatments by SEM-EDS and biomechanical test. Journal of Osseointegration v. 1, n. 1, p. 25 -31, 2009.

TAVARES, H.S.; FAEDA S.R.; SARTORI R.; MARCANTÔNIO Jr.; ALMEIDA-FILHO E ; GUASTALDI A.C. Avaliação de implantes modificados por feixe de laser Nd:YAG e implantes de superfície usinada empregando-se MEV e Torque reverso. Rev. Implant News, 2009 (In Press).

FAEDA R.S.; TAVARES H.S.; SARTORI R.; GUASTALDI A.C.; MARCANTONIO Jr E. Evaluation of titanium implants with surface modification by laser beam. Biomechanical study in rabbit tibias. Oral Brazilian Research, n. 890, 2009 (in Press).

PRETEL H.; TAVARES H.S; SANTOS J.L.; TOMÁS H.; GUASTALDI A.C. DOSE DEPENDENT OF LOW LASER ENERGY ON HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS OSTEOGENIC DIFFERENTIATION AND PROLIFERATION Lasers in Surgery and Medicine, 2009.

TAVARES H.S.; GUASTALDI A.C.; TOMÁS H.; SANTOS J.L. Biomineralization on nanostructured titanium surfaces by laser beam employing human mesenchymal stem cell culture. A ser submetido na revista Biomaterials 2009.

PRETEL H.; TAVARES, H.S.; PIRES J.R.; PRETEL H.S. Sorriso Perfeito X Inimigo Invisível. Journal DMC, v. 3, p. 25-26, 2008.

BRAGA F.J.C.; TAVARES H.S.; FAEDA R.; GUASTALDI F.P.S.; GUASTALDI A.C. Estudo comparativo empregando-se torque reverso em implantes de titânio modificados por laser e recobertos com hidroxiapatita pelo método biomimético. In: CBECIMAT- Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 17, 2006.

TAVARES, H.S. et al. Estudo cefalométrico das alterações no perfil facial em pacientes classe III dolicocefálicos, submetidos à cirurgia ortognática bimaxilar. Revista Dental Press de ortodontia e ortopedia facial, Brasil, v. 10, n. 5, p. 108-121, 2005.

TAVARES, H.S. et al. Reconstrução de maxila atrófica com enxerto ósseo de calota craniana para instalação de implantes osseointegrados. Implant News, v. 2, n. 2, p. 131-135, 2005.

3.2 Resumos em anais de eventos:

TAVARES H.S.; RIBEIRO L.N.M.; GUASTALDI A.C. APARECIDA A.H.; TOMÁS H.; SANTOS J.L. Biomineralization of human stem cells on nanostructured titanium surfaces by Yb:YAG laser. Neodent International 2009, Brasil. Mensão Honrosa de melhor trabalho apresentado

TAVARES H.S.; GUASTALDI A.; OLIVEIRA N.T.C. In Evaluation of implants surface modified by laser beam Nd:YAG and machined implants using SEM and reverse torque test. WORLD BIOMATERIALS CONGRESS, 8th, WBC 2008, realizado em Amsterdam RAI, Netherlands, 2008

TAVARES H.S.; FAEDA R.S.; SARTORI R.; ALMEIDA-FILHO E.; GUASTALDI A.C.; MARCANTONIO-Jr E. Study on implants subjected to four different surface treatments by SEM-EDS and biomechanical test. In: PROCEEDINGS OF THE REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA ODONTOLÓGICA, SBPqO, e REUNIÃO DA FEDERAÇÃO LATINA AMERICANA/IADR, 24^a, V.21, p.59-60, 2007.

FAEDA R.S.; SARTORI R.; TAVARES H.S.; GUASTALDI A.C.; MARCANTONIO-JUNIOR E. Implantes de titânio modificados por ablação a laser e recobertos por hidroxiapatitas biomimética. Estudo biomecânico. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA ODONTOLÓGICA, Anais 23, 2006.

FAEDA R.S.; TAVARES H.S.; SARTORI R.; GUASTALDI A.C.; MARCANTONIO E Jr. Avaliação de implantes de titânio com modificação da superfície por ablação a laser. Estudo biomecânico em tibia de coelhos. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS, Anais, 2006

FAEDA R.S.; TAVARES H.S.; SARTORI R., GUASTALDI F.P.S.; GUASTALDI A.C.; CIRELLI J.A.; MARCANTONIO-Jr, E. Avaliação do padrão de osseointegração em superfície de implante modificada por laser. Teste biomecânico em coelhos. In: Brazilian Oral Research, v.19, p. 199, 2005. (Proceedings of 22nd Annual SBPqO Meeting)

TAVARES H.S.; GUASTALDI A.C.; FAEDA R.; BRAGA F.J.C.; MARCANTONIO Jr. E. Modificações de superfícies de implantes osseointegrados irradiados por feixe de laser Nd-YAG. In: ENCONTRO DO GRUPO BRASILEIRO DE MATERIAIS DENTÁRIOS, Anais, 2005

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais: Maria da Paz e Antônio Favares,
Irmãos: Flávio, Antônio, Leonardo e José Vitor.
Em especial à minha esposa Mariana pelo companheirismo, amor e
paciência.
E à todas as pessoas que fizerem bom uso das
informações aqui apresentadas.*

AGRADECIMENTOS

Os meus mais sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Antônio Carlos Guastaldi, orientador e coordenador do Grupo de Biomateriais por ter conduzido com muito profissionalismo e disciplina o Grupo de Biomateriais.

Aos amigos, companheiros e colaboradores do Grupo de Biomateriais. Dr Nilson Tadeu Camarinho Oliveira, Anahi Herrera Aparecida, Edson Almeida Filho, Alexandre Félix, Marcus Vinícius, Camila Scapin, Diego Clemente de Souza e Thallita Pereira Queiroz

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia em especial o Prof. Dr. José Roberto Ernandes e Prof. Dr. Maria Célia Bertolini. Pelo incentivo na fase inicial do doutoramento e pelo aconselhamento da importância na experiência adquirida no estágio de doutoramento no exterior PDEE

Aos funcionários do Instituto de Química, secretaria da Pós-Graduação e Biblioteca. Em especial ao Sr Sebastião, Carmem, Regina, Célia, Sandra e Wennia. e Sra Cristina pela cuidadosa correção das referências.

Prof. Dra Lizete Toledo de Oliveira Ramalho pela oportunidade do estágio como tutor junto ao Grupo de estudos em Biologia Óssea GEBO. Obrigado pelas valiosas discussões e sugestões, especialmente pela amizade e pela confiança depositada em nosso Grupo de pesquisa.

Ao Grupo de Estudos em Biologia Óssea-Unesp. Prof. Dra Lizete Toledo de Oliveira Ramalho, Prof. Dr. Juliana Rico Pires, Prof. Dr. Hermes Pretel, Prof. Rubens Spin Neto, Prof. Frank Ykeda. Pelos momentos de aprendizagem, trabalho e descontração. Especialmente pela verdadeira amizade construída durante vários anos de convivência.

À minha segunda família e amigos: Jaime, Maria Francisca, Luís Gustavo, Juliana, Alisson Veríssimo, Alexandre Fraga, Daniel Pereira Lopes de Azevedo, Taísa Moreti, Matheus Guilherme Lucas, Guilherme Valverde, Pablo Chiari, Mariana Novaes, Luís Gustavo Bolognesi, Rogério Margonar, Luciano (Zeca Pagodinho), Marco de Luca, Paulo Mangilli, Elaine Leonel, Fernando Bezzon, Frederico Bordini, Rodrigo Marques, Rodrigo Maia de Toledo, Virgínia Mesquita Barros, Vila, Roberto e Sônia Moroshima, Ana Lúcia e Sérgio, e Rogério de Souza e Castro (*in memorian*).

Ao grande amigo e Prof. Pedro Paulo Chaves de Souza, pelo exemplo de humildade e genialidade, colaborou valiosamente para a realização deste trabalho que resultou em um importante desenvolvimento graças ao estágio concedido na USP sob sua supervisão.

À Professora Dra Helena Maria Pires Gaspar Tomás por ter me orientado e acolhido com atenção e seriedade junto ao grupo de Materiais Moleculares do Centro de Química da Madeira CQM, proporcionando todas as condições para a conclusão da parte biológica deste trabalho.

Ao grande amigo e companheiro Prof. Dr. José Luís Santos, exemplo de dedicação, inteligência e seriedade na pesquisa. Muito obrigado pela contribuição científica e por ter ensinado tudo o que foi necessário durante o estágio de Doutorado na Universidade da Madeira

Dra Deepti Pandita e Dr. Viney pela contribuição científica, cultural e pessoal.

Aos Prof. Dr. João Rodrigues e Miguel Fernandes, obrigado pela oportunidade de aprendizado proporcionado pelos seminários de grupo junto à equipe do CQM além da valiosa e diversificada experiência adquirida.

Aos colegas de Portugal: Suzana Sargo, Manuel Jardim, João Figueira, Pedro Branco, Sandra Gouveia, Carla Alves, Elena Oramas, Lília Camacho e Swarup Maiti.

À Capes e à Fundação para ciência e tecnologia do governo português FTC, pelo apoio financeiro.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho

Muito Obrigado !

RESUMO

Superfícies de titânio apresentam importantes propriedades físico-químicas e morfológicas com aplicações em muitos dispositivos que requerem interação com o tecido ósseo. O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* utilizando-se cultura de células estaminais a interação da superfície de titânio irradiado com laser em menor fluência (L1); laser com maior fluência (L2) e superfície L2 com recobrimento de apatitas, (HA). A irradiação laser Yb:YAG em diferentes parâmetros ocasionou a formação de óxidos de titânio nas superfícies irradiadas, que podem influenciar diretamente a integração biológica. As superfícies obtidas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Difração de raios X (DRX) e a camada de hidroxiapatita foi avaliada por espectroscopia no infra vermelho transformada de Fourier (FTIR) e medidas de ângulo de contato. As avaliações *in vitro* foram realizadas utilizando as superfícies L1, L2 e HA diretamente em contato com células humanas indiferenciadas. Os parâmetros biológicos avaliados foram: adesão, proliferação, e metabolismo celular. Foi determinada a concentração de fosfatase alcalina (ALP) e conteúdo total de proteína, produção de osteocalcina e diferenciação osteogênica pela associação das análises. A morfologia celular foi avaliada por MEV, e a micro análise por espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) e microscopia de fluorescência. Os resultados indicaram que todos os grupos experimentais apresentaram menor adesão e proliferação celulares nos estágios iniciais em relação ao grupo controle, com aumento da proliferação após 14 dias. Também aos 14 dias houve aumento na taxa de metabolismo celular em todos os grupos experimentais. Os níveis de ALP/Proteína associados aos dados sobre metabolismo celular indicaram sinais bioatividade do grupo HA aos 21 dias. Conclusão: A irradiação por feixe de laser é um processo rápido, limpo e reprodutível para obtenção de micro e nano estruturas. A superfície L1 obteve o melhor desempenho considerando-se os níveis de osteocalcina e as avaliações MEV-EDS

Palavras chave: Titânio, Laser, cultura de células.

ABSTRACT

Titanium surfaces have important physical-chemistry and morphological properties with many applications on biomedical devices whose have bone tissue interaction. The laser beam irradiation on titanium surfaces presented in this study was evaluated by the osseointegration of human mesenchymal stem cells. In this study was performed laser irradiation (Low fluency L1; high fluency L2; high fluency associated apatite treatment HA; and the control group machined surface). The laser irradiated structures were initially characterized by Scanning Electronic Microscopy (SEM) and x ray diffraction (DRX) the HA group was subjected apatites treatment following the characterization by DRX, contact angle measurements and Infra red spectroscopy. The biological evaluations were performed by primary culture and differentiation of human stem cell. The parameters of in vitro evaluations were: Cell adhesion and proliferation by DNA quantification, cell metabolism, and cell morphology by SEM and fluorescence microscopy. The osteogenic differentiation was determined by ALP/Osteocalcin levels associated with SEM-EDS comparison. Results: All the experimental groups show less cell adhesion and proliferation at the initial stage of experiments than control group between 1 - 7 days. After 7 days the proliferation and cell metabolism increase on all experimental groups. The SEM micrographies associated with ALP/osteocalcin levels showed significant osteogenic differentiation on L1 group with significance differences of ALP/protein levels at day 7 ($P<0.05$), in addition, the HA group shows high levels ALP/Protein at 21 days. Conclusion: The laser beam irradiation process presented is clean, rapid and easy way to obtain a layer of oxides with micro and nanostructures. The best performance was found for L1 group with significant levels of osteocalcin and associated with morphological comparison, all experimental groups showed high cell proliferation than control group at the final periods of evaluation.

Key words: Titanium, Laser, Cell culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Irradiação da amostra.	9
Figura 2. MEV da superfície da amostra 1: a) 500x, b) 1000x, c) 3000x e d) 5000x	14
Figura 3. MEV da superfície da amostra 2: a) 200x, b) 500x, c) 1000x e d) 3000x.	15
Figura 4. MEV da superfície da amostra 3: a) 200x, b) 1000x, c) 3000x e d) 5000x.	15
Figura 5. MEV da superfície da amostra 4: a) 200x, b) 1000x, c) 3000x e d) 5000x.	16
Figura 6. MEV da superfície da amostra 5: a) 1000x, b) 3000x e c) 5000x.	16
Figura 7. MEV da superfície da amostra 6: a) 500x, b) 1000x, c) 3000x e d) 5000x.	17
Figura 8. MEV da superfície da amostra 7: a) 500x, b) 1000x, c) 3000x e d) 5000x.	17
Figura 9. MEV da superfície da amostra 8: a) 500x, b) 1000x, c) 3000x e d) 5000x.	18
Figura 10.(a) O difratograma de raios X da superfície usinada. O difratograma Figura (b) Difractometria da superfície experimental L1 (c) Difractograma da superfície L2 (d) Difractograma da superfície HÁ.	19
Figura 11. Recobrimento de apatita obtido sobre superfície L2: MEV (a)500X, (b) 1000X e (c) 5000X e (d) espectro de EDS.	20
Figura 12. DRX do grupo HA	20
Figura 13. Espectro de FTIR do recobrimento de apatita obtido no grupo HA.	21
Figura 14. Viabilidade celular após 7 dias de cultura.	22
Figura.15. Adesão celular após 12 e 24 horas	29
Figura.16. Proliferação celular,quantificação do DNA	30
Figura.17. Metabolismo celular	31
Figura 18. Concentrações de ALP por proteína.	32
Figura 19. Produção de osteocalcina.	33

Figura 20. MEV em alta magnificação sobre a superfície do titânio após 1 dia, (a) Superfície usinada escala 4 μ m, (b) L1 escala 2 μ m, (c) L2 escala 2 μ m e HA escala 2 μ m.	34
Figura 21. MEV após 1 dia as superfícies,(U,L1,L2,e HA) e seus respectivos aumentos dispostos na horizontal.	35
Figura 22. MEV após 3 dias as superfícies (U,L1,L2,e HA) e seus respectivos aumentos estão dispostos na horizontal.	36
Figura 23. MEV após 7 dias as superfícies (U,L1,L2,e HA) e seus respectivos aumentos estão dispostos na horizontal.	37
Figura 24. MEV após 14 dias as superfícies (U,L1,L2,e HA) e seus respectivos aumentos estão dispostos na horizontal.	38
Figura 25. MEV após 21 dias superfícies (U,L1,L2,e HA) e seus respectivos aumentos estão dispostos na horizontal.	39
Figura 26. MEV após 28 dias superfícies (U,L1,L2,e HA) e seus respectivos aumentos estão dispostos na horizontal.	40
Figura .27. MEV proliferação celular aos 14 dias ,e seus respectivos EDS.	41
Figura .28. MEV proliferação celular aos 21 dias, à direita seus respectivos EDS.	42
Figura.29. MEV proliferação celular aos 28 dias, à direita seus respectivos EDS.	43
Figura 30. Microscopia de fluorescência superfície Usinada nos períodos (a) 1, (b) 3 e (c) 7 dias; L1 nos períodos (d) 1, (e) 3 e (f) 7 dias; L2 nos períodos (g) 1, (h) 3 e (i) 7 dias; HA nos períodos (j) 1, (k) 3 e (i) 7 dias.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração iônica da solução SBF	11
Tabela 2. Referências de ângulos de contato e condições de molhamento	13
Tabela 3. Ângulo de contato das amostras experimentais	21

ABREVIATURAS E SIGLAS

A: angstroms

ALP: alkaline phosphatase

ANOVA: análise de variância

ASTM F-67: standard specification unalloyed titanium for surgical implant

BCA: bicinronic acid

CPDS: Committee for powder diffraction studies

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DNA: deoxyribonucleic Acid

DRX: Difração de raios x

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

ESD: Espectroscopia por energia dispersiva de raios X

h: horas

HA: grupo experimental hidroxiapatita

ISO 10993: avaliações de biocompatibilidade de dispositivos médicos.

Kg: quilogramas

kHz: quilohertz

L1: grupo experimental Laser com menor fluência

L2: grupo experimental Laser com maior fluência

M: molar

MEM: minimum essential medium

MEV Microscopia eletrônica de varredura

min: minutos

mm: milímetros

mM: milimolar

mmol.dm⁻³ : número de moles por decímetro cúbico

MTT: 2,5-diphenyl tetrazolium bromide

NaOH: hidróxido de sódio

Nd:YAG: neodymium-doped yttrium aluminium garnet

nm: nanômetro

nM: nanomolar

°C: graus Cécius

PBS: phosphate buffered saline

pH: potencial de hidrogênio

RFU: relative fluorescence unit

SBF: simulated body fluid

TCPS: placa de cultura de poliestireno

Ti cp: titânio comercialmente puro

U/ml: unidade por mililitro

U: grupo experimental usinado

W: watt

Yb:YAG: ytterbium- doped yttrium aluminium garnet

Θ : ângulo teta

μL : microlitro

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivo	6
CAPÍTULO I	
3. Objetivo específico	8
4. Materiais e Métodos	8
4.1. Irradiação das amostras	9
4.2. Seleção as superfícies irradiadas com feixe de laser	9
4.3. Preparo da superfície para deposição de Hidroxiapatita	10
4.4. Deposição de Apatitas pelo Método Biomimético	10
4.5. Caracterização físico-química das superfícies	11
4.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura-MEV	12
4.6. Difractometria de raios X. DRX	12
4.7. Espectroscopia no Infra Vermelho FTIR	13
4.8. Medidas de ângulo de contato	13
5. Resultados	14
5.1. Resultados MEV	14
5.2. DRX das amostras selecionadas para aplicação <i>in vitro</i> .	18
5.3. Resultados Grupo Hidroxiapatita	19
5.4. Resultados de Medida de ângulo de contato	19
6. Estudo Piloto: Cultura celular	22
CAPÍTULO II	
7. Objetivo específico	24
8. Materiais e Métodos	24
8.1. Cultura de células estaminais	24
8.2. Adesão e proliferação celular	25
8.3. Avaliação do metabolismo celular	25
8.4. Diferenciação celular e osteogênese	26
8.4.1. Produção de fosfatase alcalina	26
8.4.2. Conteúdo de proteína total	26
8.4.3. Produção de Osteocalcina	27
8.5. Morfologia celular por MEV	27
8.6. Morfologia celular por Microscopia de Fluorescência	28
9. Tratamento Estatístico	29
10. Resultados	29
10.1. Adesão celular	29
10.2. Proliferação celular	30
10.3. Metabolismo celular	30
10.4. Fosfatase Alcalina e Proteína Total	31
10.5. Produção de Osteocalcina	32
10.6. Resultados MEV-EDS	33
10.7. Resultados EDS	41
10.8. Resultados de Microscopia de Fluorescência	44
11. Discussão	46
12. Conclusão	49

1. Introdução e revisão da literatura

O titânio é um biomaterial metálico utilizado em diversas aplicações biofuncionais em especial, na reparação óssea em vários tipos de dispositivos biocompatíveis. A resposta biológica favorável na presença de óxido de titânio envolve importantes propriedades de superfície tais como: composição química, molhabilidade, energia e morfologia de superfície (CURRAN, 2005; LI, 2007; RUPP, 2004; TRAINI, 2008; ZHAO, 2007; ZHAO, 2005). A fina camada de óxido de titânio apresenta proteção à estrutura cristalina subjacente contra os efeitos corrosivos do ambiente biológico. O óxido de titânio apresenta boas propriedades mecânicas e químicas seu óxido é virtualmente inerte no organismo (SETO, 2001).

Muitas técnicas têm sido empregadas para melhorar a superfície do titânio que são modificadas para aumentar a área de contato com o tecido ósseo, possibilitando a longo prazo um maior índice de sucesso, entretanto representam uma etapa a mais no processamento industrial, podendo apresentar em sua superfície, elementos contaminantes que vão interagir diretamente com o organismo (ALBREKTSSON, 2004; KARAGEORGIU, 2005; LI 2004; LI, 1995; PETO, 2002; SCHLIEPHAKE, 2008; ZINGER, 2004).

As superfícies rugosas parecem melhorar a organização da rede de fibrina, o que influencia positivamente as reações ocorridas na interface titânio/célula (ROMPEN, 2006).

Em avaliação in vivo na tíbia de coelhos, observou-se que a resistência biomecânica de implantes com superfície tratada por laser foi significativamente maior no grupo tratado em relação ao grupo controle. Após 12 semanas constatou-se por análise histomorfométrica, haver maior quantidade de tecido ósseo formado nas roscas do implante irradiado quando comparado aos implantes não irradiados (CHO, 2003).

As aplicações clínicas em odontologia e medicina que requerem o estabelecimento da interface rígida e calcificada apresentam um consenso quanto à necessidade clínica da ocorrência da osseointegração, constituída basicamente pela completa união entre a superfície do biomaterial e o tecido ósseo sem a formação de tecido fibroso, e é alvo de muitas pesquisas (BRÅNEMARK, 1983; ANSELME, 2000; BRÅNEMARK, 2001; ALBREKTSSON, 2004; MÜLLER, 2006; CHAI, 2007; OLIVEIRA, 2008; GRAF, 2008; HACKING, 2008).

A morfologia da superfície pode influenciar e melhorar a resposta celular pelo controle das interações físicas e químicas no contato focal célula/superfície, a rugosidade da superfície influencia a adesão e o espalhamento celular, esses fatores podem influenciar as pesquisas o que melhoram o desempenho biológico por meio da fixação nano mecânica, (MÜLLER, 2006) o que requer o aperfeiçoando do desenho estrutural e micro estrutural dos dispositivos biomédicos (CHEN, 2007; GUO, 2006; JANMEY, 2007; JAZEDJE, 2009; MASTROGIACOMO, 2005; PROTIVINSKY, 2007).

O sucesso dos sistemas implantáveis no tecido ósseo depende da formação de uma interface mecanicamente estável entre o biomaterial e o hospedeiro, muitos processos bioquímicos ocorrem durante as fases iniciais de adesão (PULEO, 1999).

Aos biomateriais são exigidos o melhor desempenho, buscando amenizar os distúrbios causados na homeostase no tecido ósseo, portanto os implantes devem de alta qualidade por que durante a formação óssea a liberação de produtos indesejáveis nos tecidos deve ser minimizada, de outra maneira ocorreria a formação de “debris” no local, podendo influenciar na interação biomecânica dos implantes (WILLIAMS, 2008).

A utilização do feixe de laser como ferramenta modificadora de superfícies de implantes está baseada na criação de uma população de elétrons estimulados, a saírem do seu estado natural para um estado de maior energia, que ao retornarem ao seu estado original, emitem fótons com uma energia correspondente a energia de transição do elétron. Este processo em cadeia gera uma avalanche de emissões estimuladas formando um feixe de fótons o qual pode ser transportado através de um espelho semitransparente como uma luz altamente monocromática e direcional, permitindo assim se obter um foco extremamente preciso o que incide com uma determinada energia elevando a temperatura do titânio até uma fase de plasma, e gera a modificação físico química da superfície (BRAGA, 2007).

As modificações de superfície do titânio por feixe de laser avaliadas no presente estudo apresentam características físico-químicas avaliadas previamente in vivo. Como o processo de obtenção de superfícies nano estruturadas a laser é controlado e não apresenta elementos contaminantes em sua estrutura, supostamente parece ser um método apropriado para aplicação clínica (TAVARES, 2009; FAEDA, 2009; TAVARES, 2005).

Para avaliar o efeito dos biomateriais no organismo são utilizados métodos de estudos *in vitro* previamente à aplicação clínica. As avaliações experimentais empregando-se culturas primárias apresentam vantagens em relação ao método *in vivo*, tais como: reprodutibilidade, rapidez de resultados, alta sensibilidade, sem utilizar de animais para a pesquisa. Sistemas *in vitro* possibilitam a obtenção de resultados rápidos e confiáveis devido à impossibilidade técnica de interferências na realização dos ensaios (BELOTI, 2008; DE OLIVEIRA, 2008; KAPLAN, 2005; KHADRA, 2005; LI, 2004; ROMPEN, 2006; ROSA, 2003a; b; RUPP, 2004; TALLHEDEN, 2005; WENNERBERG, 2004; XAVIER, 2003). O controle e a reprodutibilidade dos estudos *in vivo* apresentam maior número de variáveis que podem influenciar os resultados das pesquisas.

Vários métodos de estudo foram padronizados em culturas celulares, para avaliação da biocompatibilidade, citotoxicidade, proliferação e viabilidade celular (ISO 10993). Previamente à aplicação *in vivo*, os biomateriais podem ser avaliados levando-se em consideração as reações bioquímicas que participam do processo inicial de adesão celular. Por ser um método sensível e possível obter respostas confiáveis e reprodutíveis observando-se os eventos biológicos que ocorrem na interface célula/substrato (BELOTI, 2005; BELOTI, 2008; BOYAN, 1996; ROSA, 2003a; b; SCHWARTZ, 2003). Tem sido gradativamente maior a utilização de modelos de cultura de células obtidas da medula óssea para o estudo das interações osso/biomaterial e a regulação da osteogênese por diversos agonistas (OLIVEIRA, 2008; ROSA, 2003b).

Os estudos de proliferação e diferenciação celulares sobre biomateriais contribuem para o desenvolvimento de novos dispositivos biomédicos. Os biomateriais que apresentam boa interação no processo de reparo ósseo e para a substituição de partes perdidas obtiveram um desenvolvimento rápido, tornando as reconstruções maxilo faciais, a colocação de próteses em fêmures, procedimentos cirúrgicos de rotina (BRUNSKI, 2000).

As avaliações biológicas iniciais dos biomateriais pelo método *in vitro* podem apresentar uma rápida resposta. Em ambiente desfavorável, as células facilmente sofrem lise, o que sugere um biomaterial não ser adequado do ponto de vista celular. Diversos elementos liberados pelos biomateriais ao longo do tempo também podem induzir uma má resposta celular. Para se induzir a diferenciação em tecido ósseo é necessário que toda a cadeia de reações bioquímicas ocorra na faixa de

tolerância vital da cultura em questão. O custo experimental é reduzido e existe um bom controle de variáveis no sistema *in vitro*. em comparação ao método *in vivo*. (HACKING, 2008).

O método de avaliação *in vitro* utilizando-se culturas de células mesenquimais indiferenciadas em biomateriais metálicos, foi utilizado por serem essas, as próprias células com as quais os implantes vão interagir quando utilizados *in vivo* (COOPER, 2000). Culturas de células humanas têm sido utilizadas em avaliações de biocompatibilidade proliferação e diferenciação celular em vários biomateriais, pode ser observado que atividade das células estaminais sofre influência de fatores físicos durante os processos de regeneração e diferenciação (BALL, 2001; BOSKEY, 2008; EVEN-RAM, 2006; KHADRA, 2005).

As células que apresentam fenótipo osteoblástico formam em fases avançadas de mineralização, hidroxiapatita biológica, que está presente no tecido ósseo vivo e esta se diferencia da HA obtida por métodos sintéticos, por ser de menor cristalinidade, e apresentar substituições iônicas em sua estrutura. Considera-se que estas características desempenham um papel importante em seu comportamento biológico. Superfícies com hidroxiapatita têm forte influência na bioatividade e biocompatibilidade de culturas celulares e a combinação de cristalinidade com fases específicas de Cálcio e Fósforo afetam fortemente a bioatividade *in vitro* (CHOU, 2005; JALOTA, 2007; SARGEANT, 2008; YONGGANG, 2007; ZHENG, 2008).

A deposição de matriz mineralizada é considerada o evento final no processo de diferenciação osteoblástica sendo essencial para que ocorra a osseointegração e a fixação nano mecânica à superfície do titânio. (SCHLIEPHAKE, 2008),

A fase de adesão celular ocorre em curto período e envolve eventos físico-químicos, forças iônicas e forças de Van de Waals que atuam entre o citoplasma e a superfície do biomaterial. A adesão celular ao longo do tempo envolve a interação de várias moléculas biológicas além de proteínas da matriz extracelular, proteínas da membrana celular e cito esqueleto, que interagem juntas para induzir o sinal de transdução, promovendo à ação dos fatores de transcrição e conseqüentemente regular a expressão gênica (ANSELME, 2000).

A energia de superfície pode influenciar a adsorção e o arranjo estrutural das proteínas na superfície (BOYAN, 1996; GARCIA, 1999). As respostas de osteoblastos a superfícies quimicamente controladas indicam que superfícies

hidrofílicas favorecem a adesão e conseqüentemente a síntese de matriz extracelular podendo influenciar o potencial osteogênico quando comparados a superfícies hidrofóbicas (KENNEDY, 2006; VALARMATHI, 2008; ZHAO, 2005).

A interação laser/titânio/células proposta no presente trabalho teve como objetivo inicial o desenvolvimento para potencial aplicação clínica na área de implantes osseointegráveis, próteses ortopédicas, materiais de fixação óssea e dispositivos para utilização em neurocirurgia. Entretanto outras aplicações experimentais podem revelar uma boa interação, especialmente com sistemas de liberação controlada de fármacos, engenharia genética e tecidual, necessitando de mais estudos para comprovar sua eficiência.

2.Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliação in vitro de quatro tipos de superfícies de titânio com e sem recobrimento de apatitas, empregando-se cultura de células estaminais humanas.

CAPÍTULO I

3. Objetivo específico

O objetivo do presente capítulo foi apresentar preparação e caracterização de superfícies de Ti cp irradiadas por feixe de laser em diferentes condições experimentais com e sem recobrimento de apatitas

4. Materiais e Métodos

Amostras de titânio comercialmente puro ASTM F-67 foram usinadas com dimensões de 13,7 mm de diâmetro 2 mm de espessura. As amostras polidas com lixa 600 mesh em seguida foram limpas em acetona em banho de ultrassom por 10 min em seguida foram lavadas em água destilada (2x) seguido de secagem a 37°C por 24 h. Para a irradiação as amostras foram posicionadas de maneira que o centro da área de irradiação apresentasse a menor inclinação do feixe.

A energia do feixe de laser transferida para a superfície do titânio durante o processo apresenta intensidade e fluência controláveis. Cada condição paramétrica estabelecida produz uma superfície química e morfologicamente diferente. A interação feixe de laser-titânio conduz a efeitos térmicos durante a sequência de pulsos, e a superfície pode se fundir e até vaporizar criando um estado de plasma, o que define o fenômeno denominado de ablação o que caracteriza pela ocorrência de transporte de energia e massa de local para local na superfície irradiada. (HALLGREN, 2003; SETO, 2001; ULLMANN, 2002) O resultado do processo provoca a difusão de átomos para o titânio próximo à área irradiada, especialmente: oxigênio e nitrogênio presentes na atmosfera ambiente. Os processos de fusão e solidificação rápidas levam a um estado de não-equilíbrio com as reações químicas ocorrendo fora do equilíbrio termodinâmico, as quais dependem da temperatura e de outros fatores como comprimento de onda, intensidade, polarização, tempo de irradiação e atmosfera. (BRAGA, 2007)

4.1. Irradiação das amostras

Os procedimentos de irradiação laser foram realizados no equipamento laser pulsado Yb:YAG 20W do Departamento de Físico Química do Instituto de Química de Araraquara UNESP. Todas as amostras foram irradiadas com a mesma distância focal e pelo mesmo operador em atmosfera ambiente. Os parâmetros variáveis para a realização do presente estudo foram: frequência e a potência nominal.

Variáveis como: tempo, velocidade de varredura, distância entre varreduras e atmosfera, influenciam o controle de fases e morfologia geradas na superfície irradiada pelo feixe, que representam o efeito térmico gerado pela a energia acumulada sobre área irradiada.



Figura 1. Irradiação da amostra.

4.2. Seleção das superfícies irradiadas com feixe de laser

Foram selecionadas 8 superfícies por microscopia eletrônica de varredura entre 81 condições irradiadas experimentalmente. Os critérios de exclusão envolveram a observação de falhas de área irradiada, trincas, ausência de padronização ou áreas excessivamente irradiadas. O grupo de superfícies mais homogêneas foi obtido utilizando a potência referenciada no equipamento entre 100 e 255 com variação da frequência entre 20 a 35 kHz. As amostras obtidas foram caracterizadas por MEV-EDS e então denominadas:

Grupo controle superfície usinada: U

Grupo experimental Laser :L1

Grupo experimental Laser : L2

Grupo experimental HA: Superfície L2 submetida ao recobrimento de apatitas.

4.3. Preparo da superfície para deposição de Hidroxiapatita

Para o grupo de amostras recobertas com apatitas HA foi realizada a irradiação prévia na condição de maior fluência com o objetivo de aumentar a interação química de HA na superfície laser, seja pela presença de mistura óxidos de titânio estequiométricos e não estequiométricos, seja pela apresentação morfológica do titânio irradiado na superfície. O que favorece a formação de grupos de apatitas sobre a superfície nano estruturada de titânio (BHARATI, 2005; ZHANG, 2008). O objetivo dessa etapa foi obter na superfície do titânio irradiado um recobrimento bioativo para ser avaliado in vitro. As amostras foram preparadas pelo mesmo operador, no mesmo período e utilizando as mesmas soluções. (APARECIDA, 2009)

4.4. Deposição de Apatitas pelo Método Biomimético

O método biomimético consiste basicamente em colocar o substrato a ser recoberto em uma solução sintética, denominada *Simulated Body Fluid – SBF*, de composição iônica e pH semelhantes ao do plasma sanguíneo, pelo período de 4 dias a 37°C. Este método permite recobrir o substrato com uma camada uniforme de hidroxiapatita semelhante à apatita biológica encontrada no tecido ósseo humano (ABE, 1990).

Desde a sua primeira formulação, o Método Biomimético sofreu significantes variações, visando acelerar o processo de deposição e alterar a cristalinidade do recobrimento, incluindo pré-tratamentos do substrato e a utilização de soluções com concentração variada. Outra alteração consistiu na modificação da composição da solução biomimética, com o objetivo de possibilitar a obtenção de diferentes fases de apatitas. O método foi inicialmente desenvolvido com o propósito de se obter no recobrimento somente a Hidroxiapatita. Com o crescente interesse na utilização de outros fosfatos de cálcio como recobrimento, a autora desenvolveu soluções biomiméticas, as quais foram denominadas de SBF modificadas, possibilitando a obtenção das diferentes fases de apatita de importância biológica e o planejamento

da composição do recobrimento de acordo com a solução utilizada. (APARECIDA, 2006).

A amostra modificada por feixe de laser L2 foi utilizada para o recobrimento de apatitas visando obter uma mistura de fosfatos de cálcio amorfo semelhante à composição do osso humano. As amostras foram primeiramente lavadas em álcool, acetona e água deionizada durante 10 min. em banho de ultra-som. Em seguida foram colocadas em solução de NaOH 5.0 M, e mantidas em estufa por de 24 horas a 60 °C, com o objetivo de obter uma camada de titanato de sódio, a qual atua como sítios nucleantes para a deposição de apatitas. Após a imersão na solução de NaOH as amostras foram secas em estufa a 60 °C por 3 horas e em seguida lavadas em água destilada e banho em ultra-som por 10 minutos, para fazer a remoção de NaOH residual da superfície evitando-se a contaminação das soluções seguintes

Após o tratamento com solução de NaOH as amostras foram imersas em uma SBF modificada com o objetivo de se obter um recobrimento composto por HA carbonatada de baixa cristalinidade, tendo em vista sua semelhança com a fase mineral do tecido ósseo humano. As amostras foram mantidas em SBF modificada pelo período de 4 dias a 37 °C. Os recobrimentos obtidos foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV, Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X – EDS, Espectroscopia no Infra Vermelho Transformada de Fourier - FTIR e Difratomia de Raios X – DRX.

Tabela 1. Concentração iônica da solução SBF modificada (APARECIDA, 2009) (mmol.dm⁻³)

	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	HCO ₃ ⁻
SBF	140,4	-	-	3,1	142,9	1,86	-	5,0

4.5. Caracterização físico-química das superfícies

A caracterização físico-química das superfícies: Usinada, L1, L2 e HA foi realizada por microscopia eletrônica de varredura MEV associada à análise semi qualitativa por espectroscopia por energia dispersiva de raios X - EDS. A

composição cristalina assim como os tipos e fases de óxidos formados foram analisados via difratometria de raios X - DRX. Para a identificação dos tipos de apatitas ligadas à superfície foi realizada a análise por Espectroscopia no infra vermelho transformada de Fourier- FTIR, e medidas de ângulo de contato.

4.5.1. Microscopia eletrônica de varredura e Espectroscopia por Energia dispersiva de raios X. MEV-EDS

No presente capítulo a caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada no microscópio Philips XL Series, modelo XL 30 TMP, acoplado a um sistema de análise espectroscópica por energia dispersiva – EDS, utilizando-se ouro como material condutor. O EDS possibilita a observação do espectro inteiro de raios X de modo simultâneo à observação das imagens tridimensionais, o que permite a análise qualitativa rápida dos constituintes principais da amostra.

4.6. Difratometria de Raios X – DRX

As técnicas de difração de raios X são muito utilizadas na caracterização de materiais cristalinos, tais como metais, compostos intermetálicos, cerâmicas, minerais, polímeros, plásticos ou outros compostos orgânicos ou inorgânicos. As técnicas de difração podem ser usadas para identificar as fases presentes nas amostras de titânio.

Esta técnica cobre várias investigações, incluindo análises de fases qualitativas e quantitativas, determinação da cristalinidade, micro-identificação, determinação de parâmetros de rede, caracterização de filmes finos, e em alguns casos, análise da estrutura do cristal (CULLITY, 1978; DIETER, 1961).

No presente trabalho, utilizou-se um difratômetro de raios X SIEMENS D5000 com varredura angular entre 4 e 70°, na montagem de Bragg-Brentano, utilizando-se radiação de Cu ($K\alpha_1$) com passo de 0.05 (2θ), sendo que o tempo de passo foi de 1,0 segundo para cada amostra. A identificação das fases de apatita presentes nos recobrimentos foi realizada comparando-se os dados obtidos com as fichas padrões da base de dados mantida pelo CPDS, “Committee for Powder Diffraction Studies 2003”.

4.7. Espectroscopia no Infra Vermelho Transformada de Fourier - FTIR

O espectro de infravermelho é constituído por bandas de absorção que correspondem às frequências de ligações dos átomos que compõem o material. A intensidade dos picos nos espectros é uma indicação direta da quantidade do material presente. A intensidade é dada pela quantidade de energia absorvida pela amostra ao ser exposta a radiação infravermelha que é proporcional ao número de moléculas que interagem com a radiação. Um espectro de infravermelho é uma apresentação em duas dimensões das características de absorção de uma molécula que aparece como bandas ou picos. O equipamento utilizado neste trabalho foi Perkin Elmer, FTIR Spectrometer-Spectrum 2000 de reflectância difusa Drift Collector.

4.8. Medidas de ângulo de contato

A medida do ângulo de contato de uma gota de um líquido de interesse numa superfície tem sido usada para caracterizar a molhabilidade desta superfície, conforme apresentado na Tabela 3. A molhabilidade da superfície de um implante pode descrever a interação deste com as biomoléculas, células e organismos presentes no meio biológico (KENNEDY, 2006; RUPP, 2004).

No presente trabalho foi utilizado um medidor vídeo-based Dataphysics, modelo OCA-15, controlado por software. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente com umidade relativa do ar de 75% e a água destilada foi utilizada como líquido de medida. A leitura do ângulo de contato foi realizada 20 segundos após deposição da gota na superfície das amostras para estabelecimento do equilíbrio das forças envolvidas. Cada valor de θ foi uma média de 3 medidas.

Tabela 2: Referências de ângulos de contato e condições de molhamento (PARK, 1992)

$\theta = 0$	molhamento completo
$0 < \theta < 90^\circ$	molhamento parcial
$\theta > 90^\circ$	não há molhamento

5. Resultados

5.1 Resultados MEV

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das diversas superfícies irradiadas (Figuras 2 a 9) apresentam o efeito da irradiação utilizando 8 condições paramétricas pré selecionadas de ajuste do feixe de laser, com variação de frequência entre 20 e 35 kHz e potência referenciada no equipamento de 100 a 255. Observa-se a que a variação da potência associada à diferentes frequências produz variação morfológica (Figuras 2 a 9) e química das superfícies (Figura 10) resultante da fusão e solidificação rápidas, com zonas irradiadas homogêneas sem trincas ou rachaduras.

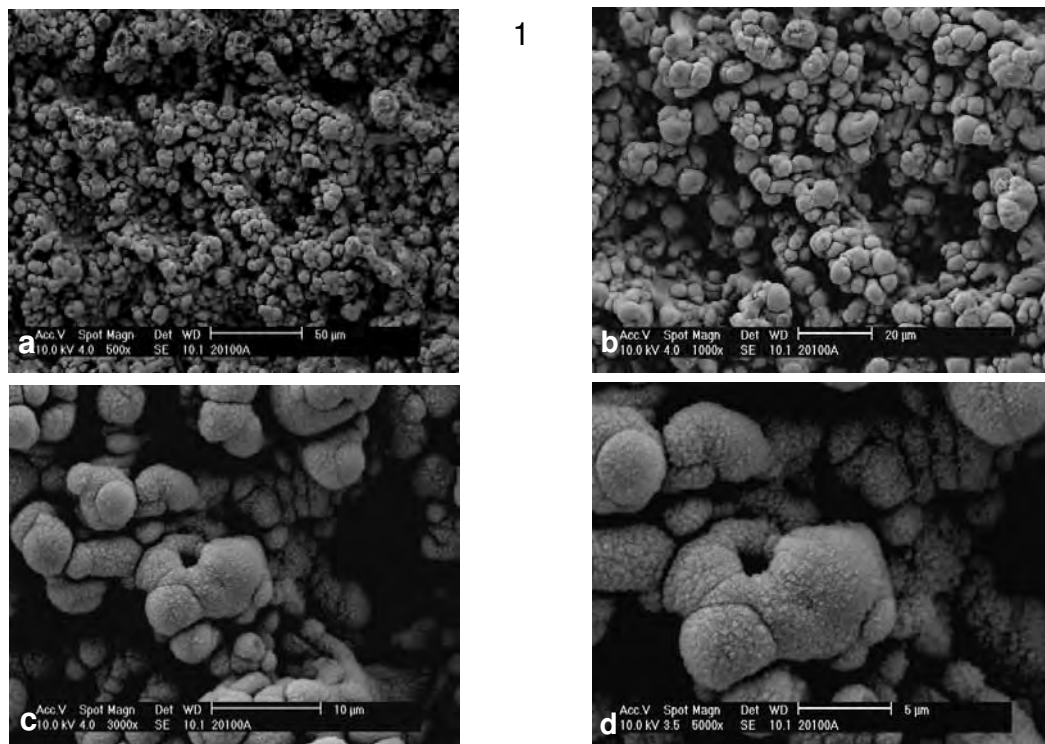


Figura 2: Morfologia da superfície da amostra 1 após a irradiação laser e seus respectivos aumentos: a) 500x, b) 1000x, c) 3000x e d) 5000x

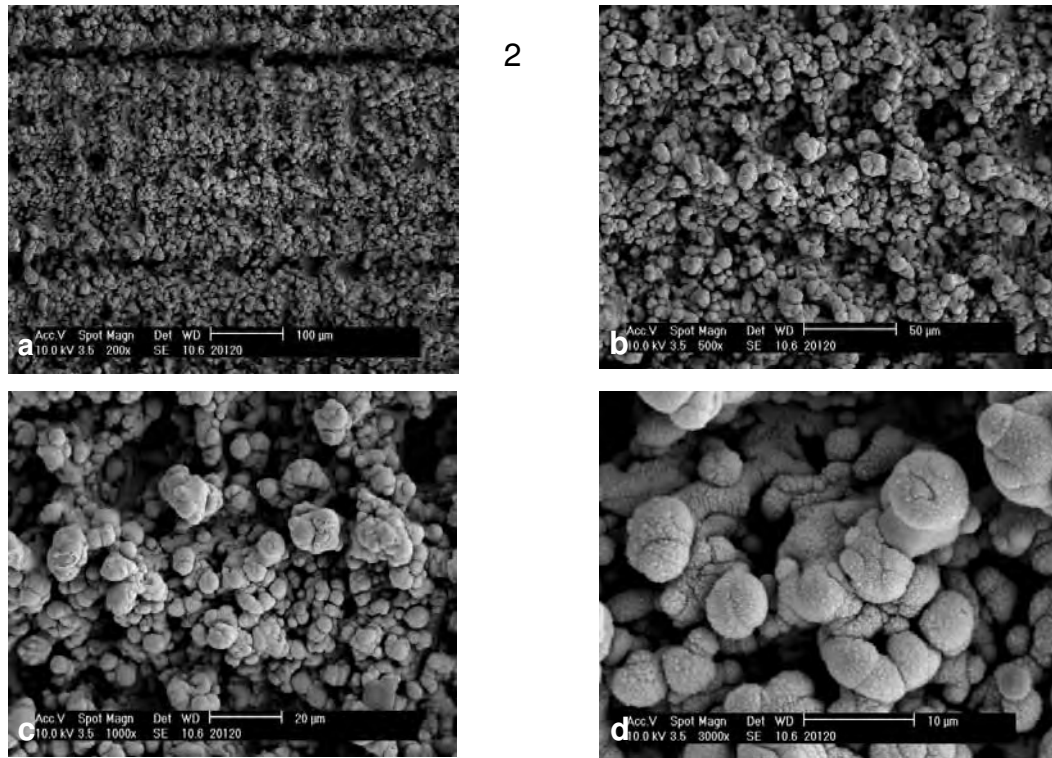


Figura 3: Morfologia da superfície da amostra 2 após a irradiação laser e seus respectivos aumentos: a) 200x, b) 500x, c) 1000x e d) 3000x.

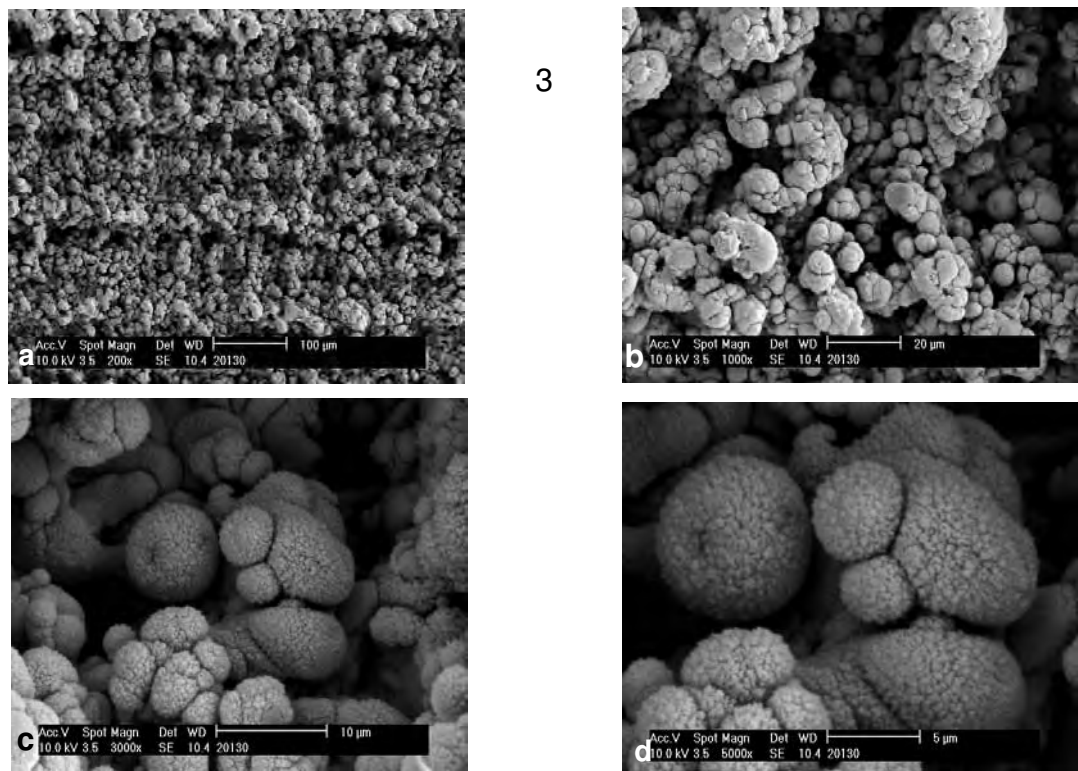
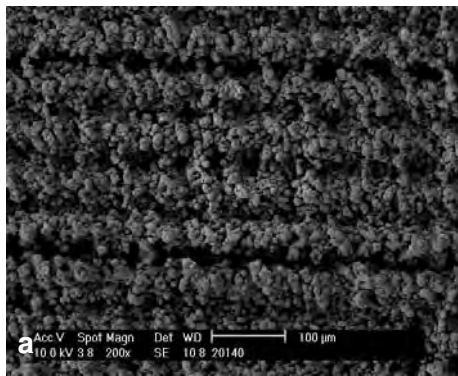


Figura 4: Morfologia da superfície da amostra 3 após a irradiação laser e seus respectivos aumentos: a) 200x, b) 1000x, c) 3000x e d) 5000x.



4

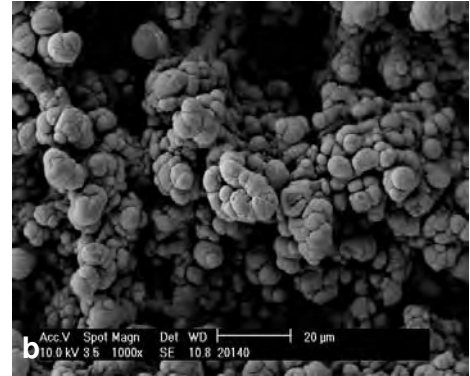
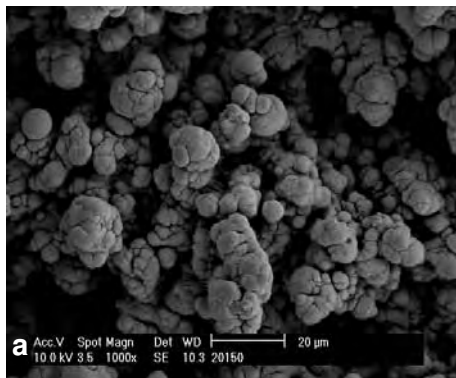


Figura 5: Morfologia da superfície da amostra 4: a) 200x, b) 1000x, c) 3000x e d) 5000x.



5

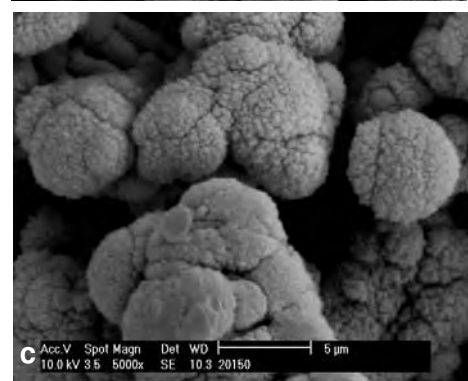
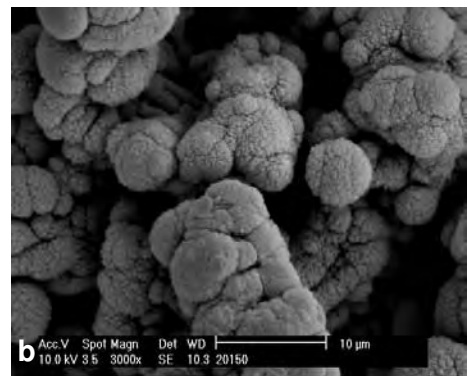
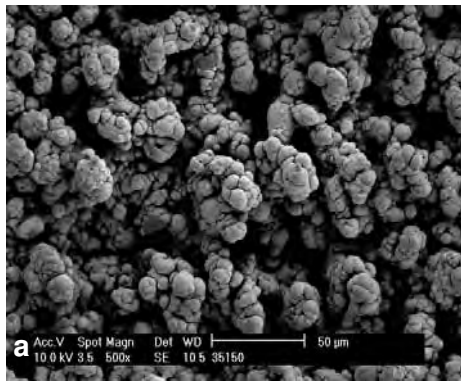


Figura 6: Morfologia da superfície da amostra 5 após a irradiação laser e seus respectivos aumentos: a) 1000x, b) 3000x e c) 5000x.



6

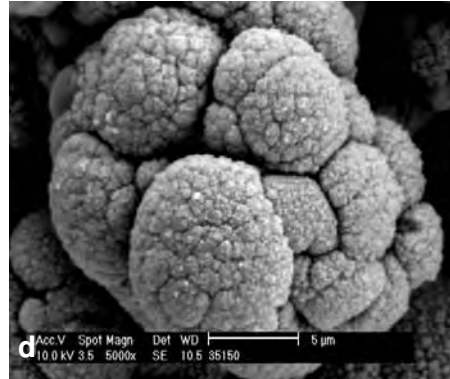
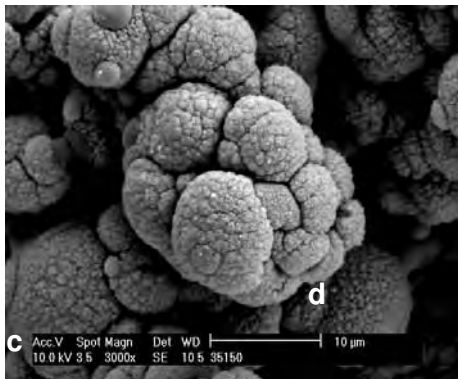
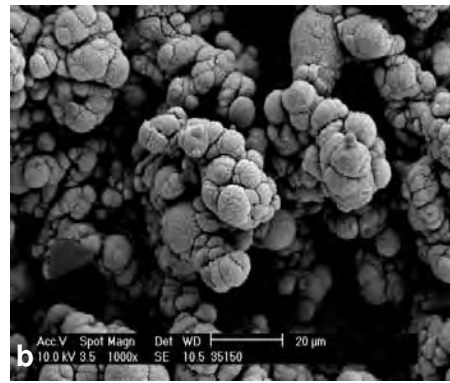
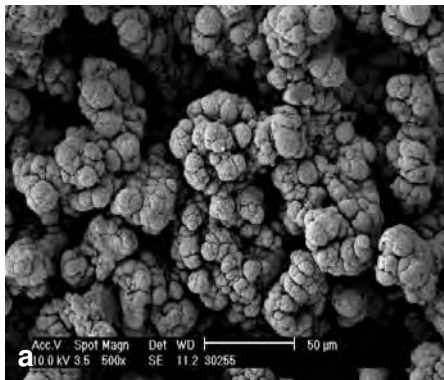


Figura 7: Morfologia da superfície da amostra 6 após a irradiação laser e seus respectivos aumentos: a) 500x, b) 1000x, c) 3000x e d) 5000x.



7

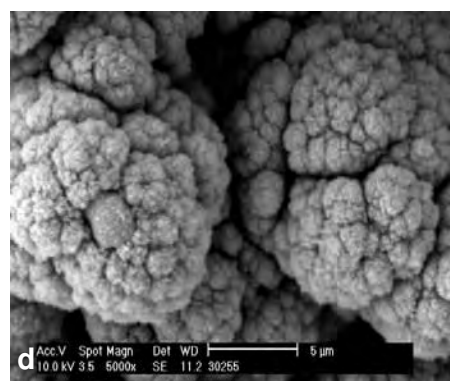
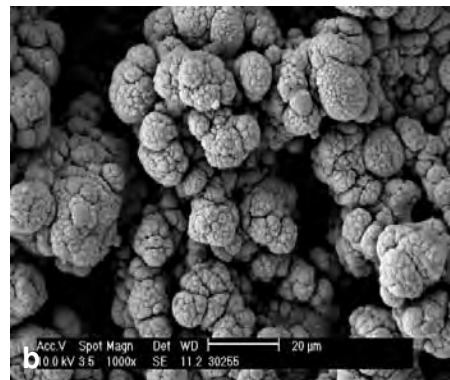


Figura 8: Morfologia da superfície da amostra 7 após a irradiação laser e seus respectivos aumentos: a) 500x, b) 1000x, c) 3000x e d) 5000x.

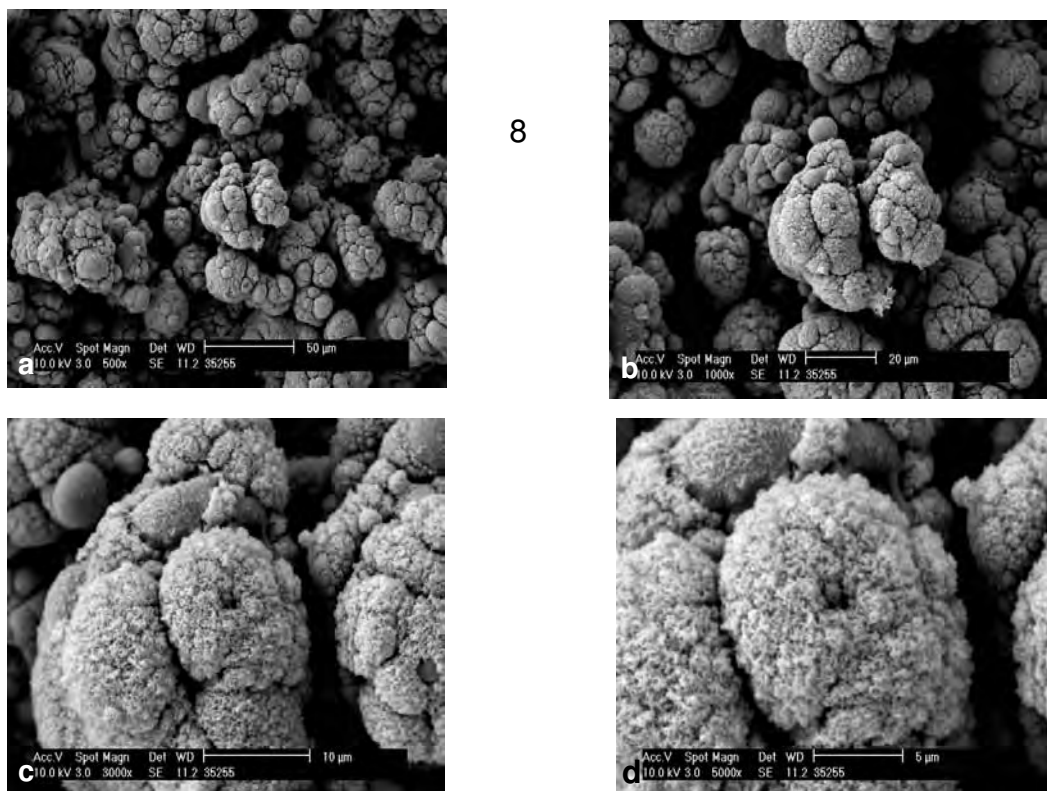


Figura 9: Morfologia da superfície da amostra 8 após a irradiação laser e seus respectivos aumentos: a) 500x, b) 1000x, c) 3000x e d) 5000x.

5.2. Difração de raios X das amostras selecionadas para aplicação in vitro:

As análises por difração de raios X apresentam a estrutura cristalina presente nas superfícies de Ti cp das amostras 4 e 8 e denominadas respectivamente L1 e L2, para realização dos estudos in vitro. O efeito da irradiação laser aumentou a presença de óxidos formados na superfície durante o processo de irradiação em atmosfera ambiente. Os íons e moléculas presentes no ar foram incluídos à estrutura cristalina do Ti cp durante o processo de irradiação, o que consiste de um meio físico (laser) para se obter a reação de oxidação ou nitretação do titânio.

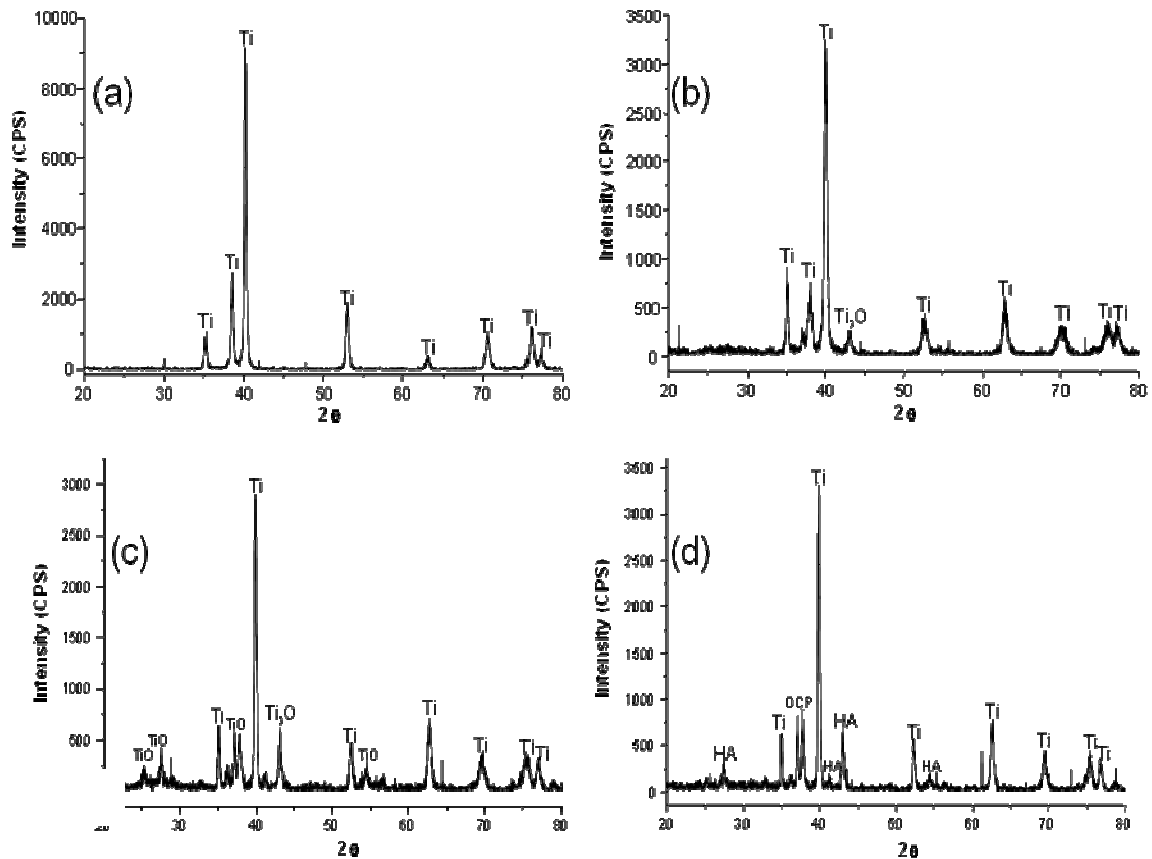


Figura 10.(a) O difratograma de raios X da superfície usinada. (b) Difratometria da superfície experimental L1 irradiada apresentando, picos de titânio metálico e seu óxido não estequiométrico Ti_3O_5 . (c) Difratograma da superfície L2 com maior presença de óxidos estequiométricos e (d) Difratograma da superfície HA com presença de apatitas.

5.3. Resultados Grupo Hidroxiapatita

As micrografias analisadas apresentam a microestrutura da camada de apatita obtida pelo método biomimético. Observa-se uma estrutura homogênea com a presença de macro e micro poros. O espectro de EDS, Figura 11d, apresenta a presença dos elementos Cálcio e Fósforo. O difratograma de raios X, Figura 12, indica que o recobrimento obtido é composto por HA carbonatada, OCP e β -TCP, sendo todas as fases de importância biológica. O espectro de infravermelho, Figura 13, apresentou bandas dos grupos dos grupos PO_4 (em 449 , 661 e 1281 cm^{-1}), $P-OH$ (em 846 e 1077 cm^{-1}), OH livre característico de HA (em 632 e 3678 cm^{-1}) e apatita carbonatada do tipo AB (em 1399 , 1463 e 1617 cm^{-1}). A banda em 1635 cm^{-1} é devido à presença de moléculas de água.

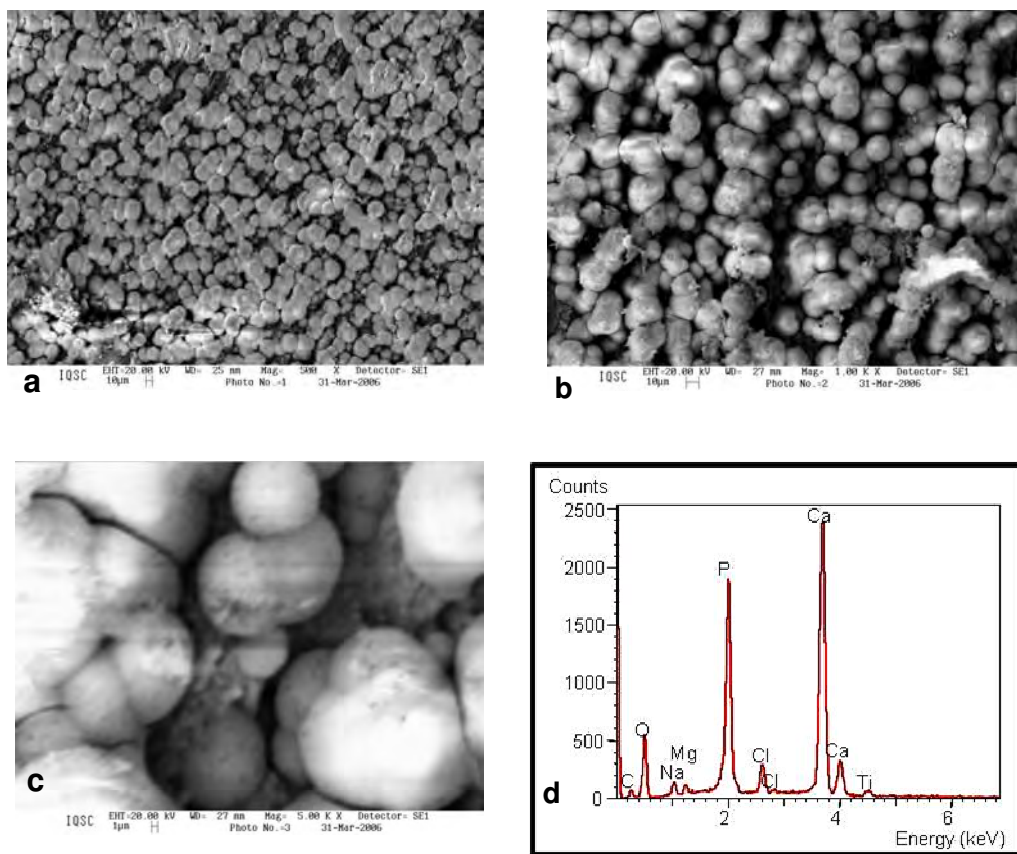


Figura 11: Recobrimento de apatita obtido sobre superfície L2: MEV (a)500X, (b) 1000X e (c) 5000X e (d) espectro de EDS.

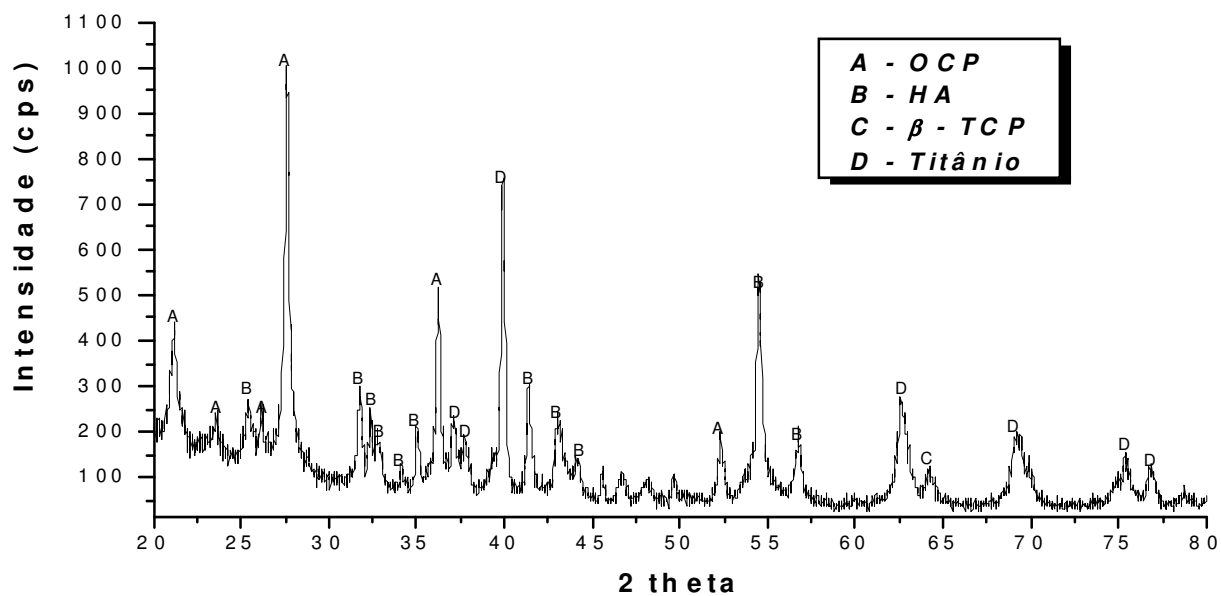


Figura 12 DRX do grupo HA

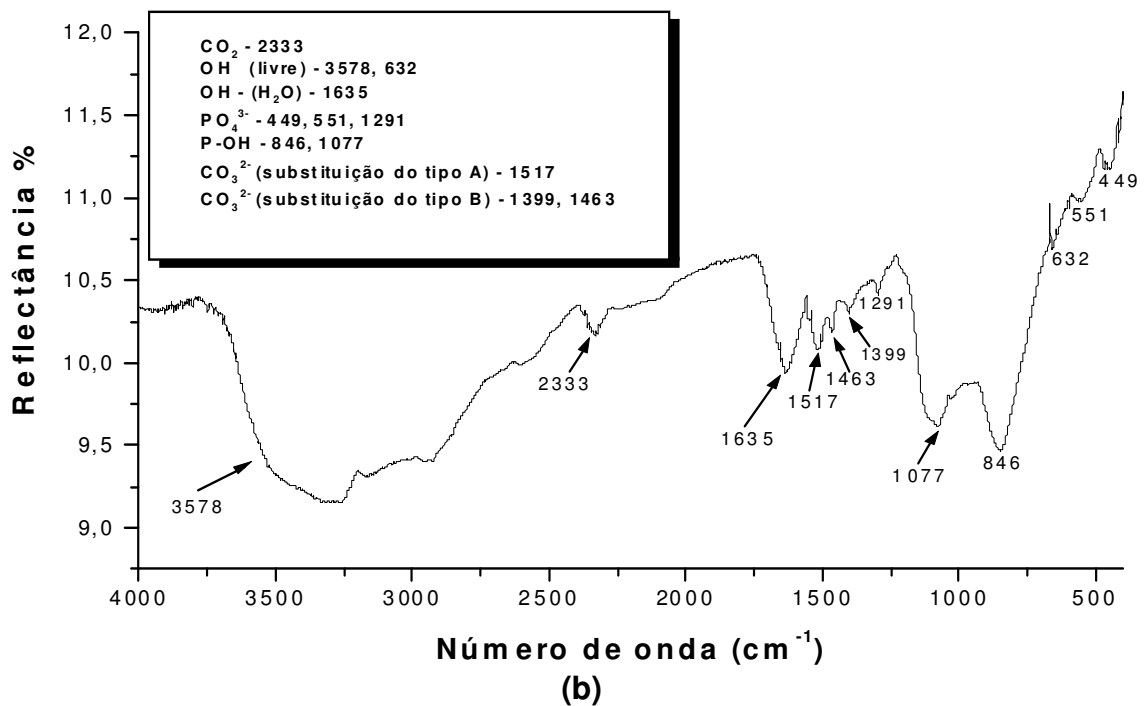


Figura 13. Espectro de FTIR do recobrimento de apatita obtido no grupo HA.

5.4. Resultados de medidas de ângulo de contato

A tabela 3 apresenta as médias das medidas (n=3) de molhabilidade das superfícies em estudo; observa-se que estas apresentaram molhamento total e instantâneo com exceção da superfície usinada.

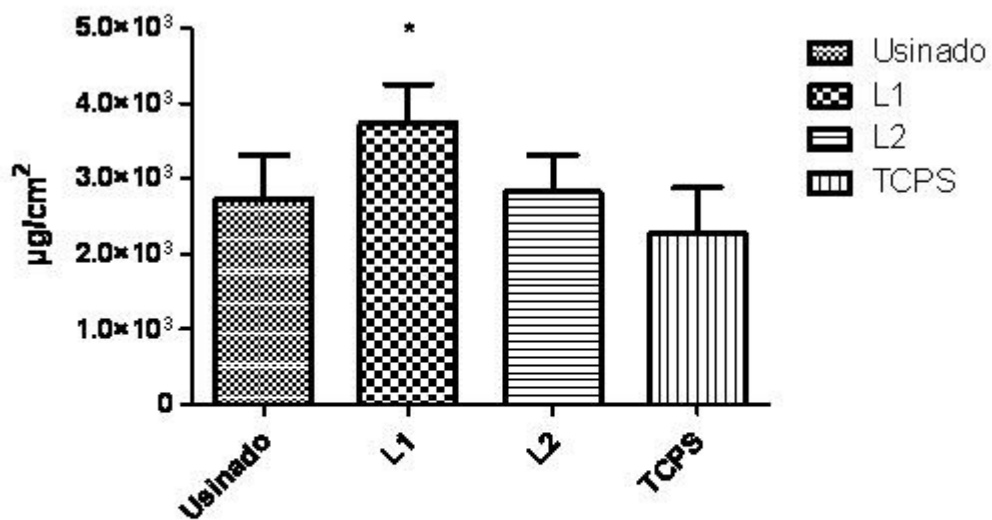
Tabela 3- Ângulo de contato das amostras experimentais

Superfície	ângulo / grau
L1	0
L2	0
HA	0
Usinado	q = 72,73

6 Estudo Piloto: Cultura celular

Foi realizado um estudo piloto no Laboratório de Bioquímica Faculdade Medicina Universidade São Paulo.

As amostras estudadas foram: Usinada, L1 e L2 considerando o controle como a placa de cultura de poliestireno (TCPS). A avaliação da proliferação celular utilizou o método MTT para cultura de células da linhagem osteossarcoma MG 63 no período de avaliação após 7 dias. Os parâmetros observados foram proliferação e viabilidade celulares. As densidades ópticas das soluções foram mensuradas por espectrofotômetro ELx 800 com leitura ajustada a 570nm de comprimento de onda, os valores obtidos foram substituídos em uma curva padrão.



O estudo piloto indicou bom desenvolvimento celular com maior proliferação celular no grupo L1.

CAPÍTULO II

7. Objetivo específico

O objetivo desta fase foi avaliar a proliferação, diferenciação e morfologia celulares empregando-se cultura de células estaminais obtidas da medula óssea humana sobre superfícies irradiadas L1, L2 e HA considerando o grupo controle a superfície usinada (U).

O estudo relacionada a cultura de células apresentado no presente capítulo, foi realizado no Centro de Química da Universidade da Madeira, Portugal sob a co-orientação da Professora Doutora Helena Tomás e apoio financeiro concedido pelo Programa de Doutorado com Estágio no Exterior PDEE Capes.

8. Materiais e Métodos

8.1 Cultura de células estaminais de medula óssea humana - hBMSC

Após a aprovação pelo comitê de ética local, foi selecionado um doador do gênero feminino de idade 16 anos, 67 Kg de peso corpóreo com bom estado de saúde geral que foi submetida à redução cirúrgica de fraturas fechadas em ambas as tíbias.

Após o acesso ao canal medular foi introduzido uma cânula de sucção com o objetivo de aspirar o conteúdo medular (30 mL). O aspirado medular foi ressuspendido imediatamente em α -MEM (Invitrogen; UK) contendo soro fetal bovino 10% (FBS, GIBCO), penicilina 100 U/ml e streptomina 100 mg/L (Invitrogen; UK) e então mantidos em incubadora umidificada a 37°C com 5% CO₂. Após 5 a 6 dias as placas contendo partículas ósseas, células hematopoéticas e fragmentos medulares foram então cuidadosamente lavadas com tampão fosfato salino PBS com o objetivo de remover as células não aderentes. Após 10 dias, as células foram enzimaticamente destacadas das placas com uma solução de tripsina/EDTA (Invitrogen; UK). Em seguida foi procedida à contagem com o auxílio de uma câmara de Neubauer, a suspensão contendo as células foi semeada novamente com a finalidade de proceder à expansão *in vitro* e a seguir foram armazenadas em criopreservador obtendo assim o número de células suficiente para execução de toda a pesquisa.

8.2 Adesão e proliferação celular

Adesão Celular

A adesão celular foi avaliada pela quantificação do DNA de células viáveis aderidas às superfícies das amostras após 12 e 24 horas. Três amostras de cada grupo foram utilizadas seguindo o protocolo abaixo.

Proliferação

As avaliações de adesão e proliferação celulares foram realizadas pela quantificação do DNA total (OLIVEIRA, 2009; PROTIVINSKY, 2007; SARGEANT, 2008). As células foram semeadas com a mesma densidade (5×10^5 células/poço) nas diferentes amostras de titânio. Os períodos de avaliação foram 12h, 1, 2, 3, 5, 7 e 14 dias, e a quantificação da concentração do DNA foi mensurada utilizando o método PicoGreen (Molecular probes Eugene, OR). As células foram lavadas 2x em PBS e lisadas utilizando água ultra pura e armazenadas a -80°C . No dia da análise a solução foi gradativamente descongelada em seguida vortexada por 10 segundos para homogeneizar a solução. Soluções padrão e amostras foram então adicionadas em cada poço com o volume de $50\mu\text{L}$ /poço. O reagente Picogreen foi adicionado em cada poço com o volume de $150\mu\text{L}$ /poço e em seguida foram encubados por 5 minutos no escuro. A fluorescência de emissão a 480nm e de excitação 520nm foi mensurada via espectrofotômetro de fluorescência (Victor 3 PerkinElmer 1420), determinando-se concentração por amostra. Os valores foram então substituídos em uma equação de curva padrão.

8.3. Avaliação do metabolismo celular

A avaliação do metabolismo celular foi realizada utilizando o método fluorescente Alamar Blue (SUN, 2006; RYAN, 2008) de acordo com as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich Inc, USA). O sinal fluorescente monitorado representa o metabolismo celular após a redução do reagente rezazurin em rezorufin durante o ciclo de respiração celular. A suspensão foi semeada cuidadosamente em placas de 24 poços contendo as amostras estéreis, em seguida foram mantidas em incubadora a 37°C e $5\% \text{CO}_2$ em meio de cultura acrescido de $100\mu\text{L}$ do reagente Alamar Blue.

Os experimentos foram realizados nos períodos de 1, 3, 7, 14, 21 dias. Após 4 horas da adição do reagente foram retiradas alíquotas de 100µL de meio de cultura metabolizado. Em seguida as amostras foram transferidas para uma microplaca para leitura em espectrofotômetro de fluorescência (Victor 3 PerkinElmer 1420) a 570 e 600 nm de comprimento de onda. Amostras sem células foram analisadas da mesma maneira como controle vazio.

8.4. Diferenciação celular e osteogênese

Para induzir diferenciação osteogênica as células foram cultivadas em meio osteogênico: α -MEM suplementado com FBS 10%, ácido L-ascórbico 50 mg/mL, β -glycerofosfato 10 mM, dexametasona 100 nM e antibióticos penicilina-streptomicina (Sigma; St. Louis, MO). O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, e em todos os experimentos foi utilizada a densidade de 5×10^5 células/poço.

8.4.1. Produção de fosfatase alcalina ALP

As amostras foram inseridas em placas de 24 poços e semeadas cultivadas e sacrificadas após 3, 7, 14 e 21 dias. As células foram lavadas duas vezes com PBS e congeladas em 400µL de triton-x 0.1%. Alíquotas de 20 µL de cada amostra foram pipetadas em uma placa com 96 poços e então foi adicionado o substrato p-nitrophenyl. As amostras foram incubadas a 37°C por 60 min. A reação foi neutralizada com adição de 10 µL de NaOH 0.02M, e a absorbância mensurada a 405 nm, usando um leitor de microplacas (Victor 3 PerkinElmer 1420). Os valores foram então substituídos em uma equação de curva padrão.

8.4.2. Conteúdo de proteína total

A quantificação de proteína foi realizada pelo método BCA (SMITH, 1985), que utiliza a detecção colorimétrica enzimática via espectrofotômetro e os valores são ajustados a uma curva padrão obtendo-se a concentração de proteína em cada amostra. O volume de lisado celular foi transferido para uma placa de 96 poços, em seguida, 200 µL de reagente BCA foi adicionado em cada poço. As amostras foram

incubadas a 37°C mantidas por 60 min. no escuro. A absorbância foi lida a 590 nm em leitor de microplacas (Jupiter x ELISA).

8.4.3. Produção de osteocalcina

A produção de osteocalcina foi avaliada utilizando o kit Intact Human Osteocalcin EIA Kit BT 46. (Stoughton, MA. USA). Os períodos de avaliação analisados foram 14 e 21 dias. O meio de cultura foi coletado e armazenado a -80 °C até o dia da análise. As amostras foram então descongeladas até a temperatura ambiente. O volume 25 µL de meio de cultura e amostras de meio de cultura sem soro fetal bovino foram então adicionados a placa de leitura do kit. (CHOU, 2005) Em seguida foi adicionado o anti soro de osteocalcina (100 µL) e então encubados no escuro a 37°C durante 2,5 horas. A solução foi então aspirada e lavada (3x) com tampão fosfato salino (PBS) 0,3 mL. Após a lavagem, 100 µL do reagente Streptavidin-Horseradish Peroxidase foi adicionado às amostras, e encubado a temperatura ambiente por 30 min. As amostras foram novamente lavadas (3x) em PBS, a seguir foi adicionado o Tetramethy benzidine associado à solução de peróxido de hidrogênio (1:1). A placa foi novamente encubada no escuro por 15 min. Uma solução de ácido sulfúrico (100 µL) foi adicionada às amostras, para parar a reação. A absorbância foi imediatamente lida a 450 nm usando o leitor de microplacas (Victor 3 PerkinElmer 1420). As concentrações de osteocalcina foram determinadas substituindo-se os valores em uma equação de uma curva padrão.

8.5. Morfologia celular por MEV

As células foram semeadas sobre as amostras nos períodos de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias mantidas em incubadora conforme o protocolo descrito anteriormente. Para a observação via MEV as células foram fixadas em paraformaldeído 3,7% em 0,14 M de solução tampão cacodilato por 20 min (PROTIVINSKY, 2007). As amostras fixadas foram então desidratadas em séries de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 99%) por 10 min. Para melhor visualização via MEV, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro obtida por pulverização a vácuo (20 mA por 2 minutos) e observadas a 15 KV. A adesão celular e a topografia das superfícies foram avaliadas utilizando Microscópio eletrônico de varredura ambiental (ESEM FEI QUANTA 400 CEMUP-Universidade do Porto). A Análise semi

quantitativa foi realizada por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDAX PEGASUS X4M Holland) objetivando localizar zonas onde houve deposição de matriz mineralizada pelas células.

8.6. Morfologia celular por Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência foi realizada empregando-se o método de coloração dos núcleos em azul pelo reagente DAPI associado à coloração do cito esqueleto em verde pelo reagente Alexafluor 488 Phalloidin, seguindo as instruções do fabricante. As micrografias foram obtidas utilizando-se um microscópio invertido Nikon TE 2000E. Os períodos de análise por microscopia de fluorescência foram 1, 3 e 7 dias.

O DAPI 4'-6-Diamidino-2-phenylindole, é um complexo fluorescente que apresenta natural especificidade pelo DNA e dupla fita do RNA e foi utilizado para a coloração dos núcleos celulares (CHOU, 2005). O Alexa Fluor 488 phalloidin é altamente foto estável e apresenta grande afinidade pelas fibras actínicas. As células foram fixadas com formaldeído 3,7% e a seguir permeabilizadas com Triton-x. Os cito esqueletos celulares foram corados e observados por fluorescência. A seguir procedeu-se a coloração dos núcleos para que pudessem ser realizadas fotomicrografias utilizando-se as mesmas células para as duas colorações.

9. Tratamento estatístico

Os dados obtidos foram inicialmente analisados pelo teste de normalidade de Lilliefors. Uma vez que os dados apresentaram uma distribuição normal utilizou-se o teste ANOVA a um critério, sendo aplicado *post hoc* o teste de Dunnett, considerando-se significativas as diferenças com $p < 0,05$. O trabalho foi realizado em triplicata exceto para os experimentos analisados por MEV-EDS e microscopia de fluorescência. Os dados foram tabulados e analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0.

10. Resultados

10.1. Adesão celular

A adesão celular está baseada na quantificação do DNA presente nas células vivas após 12 e 24 horas. Observa-se menor adesão celular nas primeiras 12 horas principalmente nos grupos L2 e HA ($P < 0,05$). Após 24 horas foi observada maior adesão celular sobre o grupo controle usinado (Figura 15).

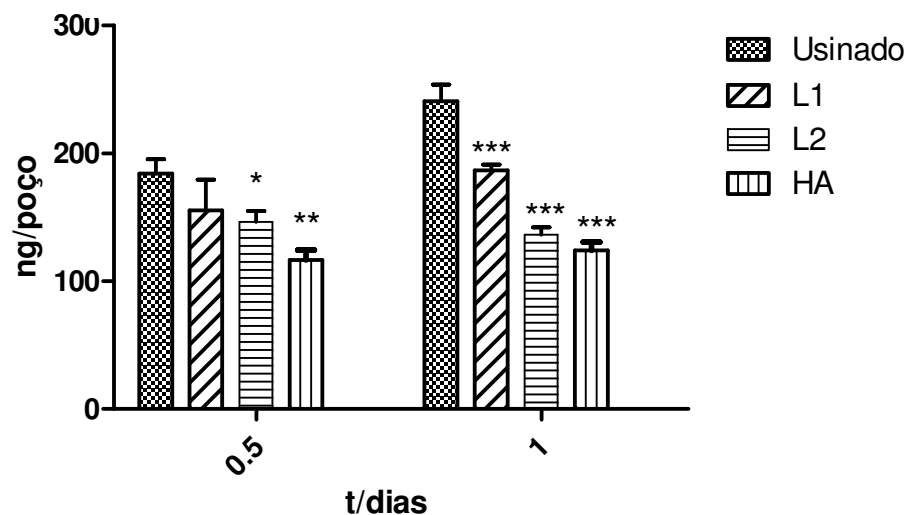


Figura.15 Adesão celular após 12h e 1 dia

10.2. Proliferação celular

O perfil de proliferação celular foi avaliado pela quantificação do DNA após os períodos de 12h, 1, 3, 5, 7, 14 e 21 dias. Observou-se nos períodos iniciais de cultura sobre as superfícies, 12h, 1, 3, 5 e 7 dias, um decréscimo de células viáveis verificado nos grupos experimentais L1, L2 e HA até 5 dias em cultura (Figura 16).

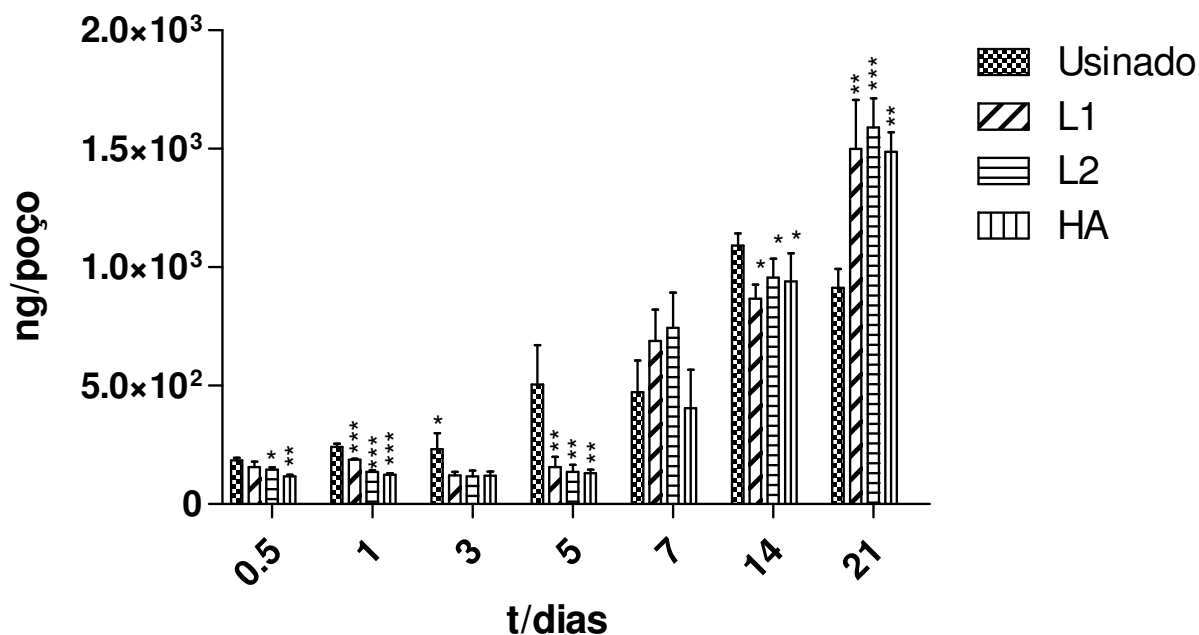


Figura.16 Proliferação celular, quantificação do DNA

10.3. Metabolismo celular

O metabolismo celular foi avaliado pela realização do ensaio Alamar Blue. Por se tratar de uma avaliação não destrutiva foi possível avaliar o perfil de metabolismo celular em todas as amostras onde verificou-se diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos. No primeiro dia houve maior taxa de metabolismo celular (RFU) no grupo HA e o grupo com menor taxa de metabolismo foi L1. Nota-se decréscimo da taxa de metabolismo celular em todos os grupos entre os períodos de 1 e 3 dias, com maior adesão na superfície do grupo Usinado que pode indicar uma preferência inicial de adesão em superfícies planas. Aos 7 dias houve aumento na taxa de metabolismo celular sem diferenças estatísticas intra grupo, exceto para o grupo HA, que apresentou menor metabolismo nesse período. No período de 14

dias notou-se significativo aumento no metabolismo celular nos grupos L2 e HA comparativamente ao grupo controle.

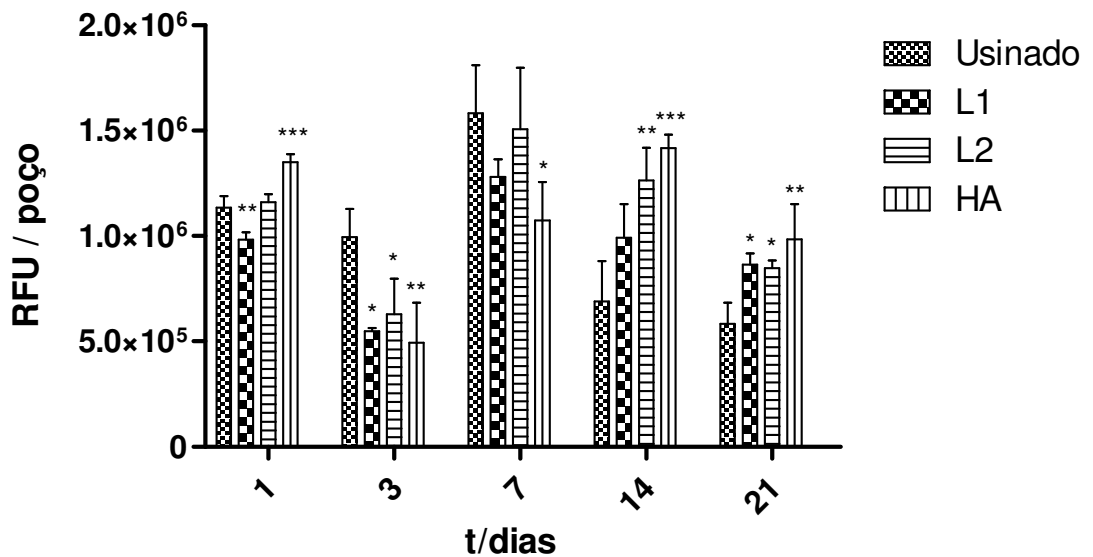


Figura.17 Metabolismo celular

10.4. Fosfatase Alcalina e Proteína total

A fosfatase alcalina óssea é uma glicoproteína específica encontrada na superfície dos osteoblastos, é um marcador bioquímico do metabolismo, e também é considerada uma substância que retrata a formação ou a reabsorção óssea. Como a formação é dependente da ação dos osteoblastos, os marcadores de formação na realidade mensuram indiretamente os produtos decorrentes da ação destas células nas fases de diferenciação celular. No período de 3 dias houve diferença significativa nos níveis de concentração de ALP por proteína nos grupos L2 e HA indicando fase inicial de diferenciação em todos os grupos. No período de 7 dias houve aumento na produção de ALP/proteína em todos os grupos experimentais. No período de 14 dias observou-se maior concentração de ALP/proteína no grupo L1. Por fim, no período de 21 dias foi observada maior concentração de ALP/proteína em todos os grupos experimentais com melhor desempenho para o grupo HA (Figura 18).

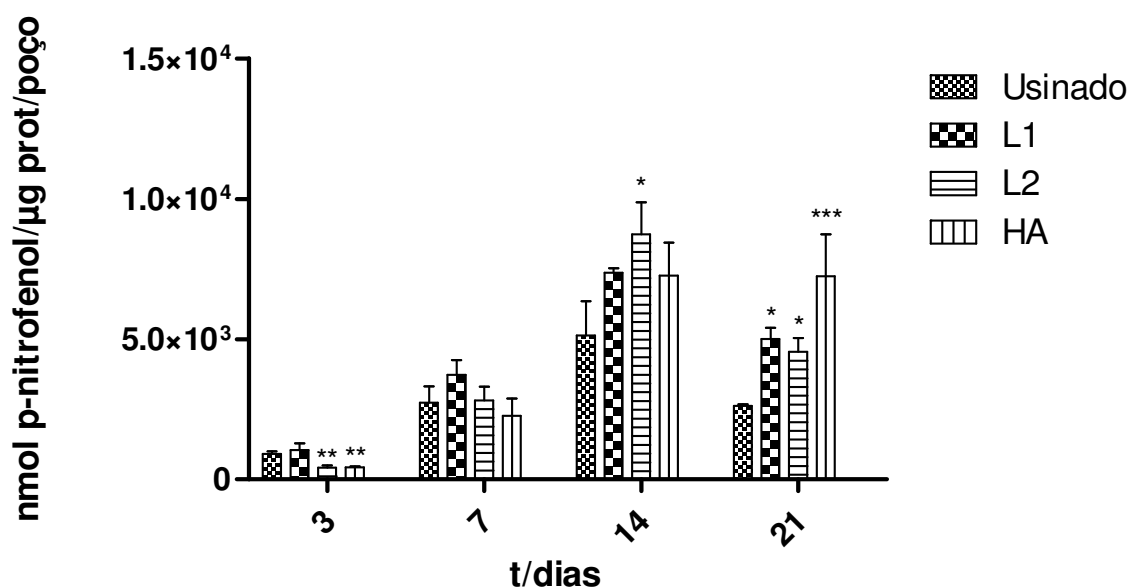


Figura 18. Concentrações de ALP por proteína.

10.5. Produção de Osteocalcina

A osteocalcina é um peptídeo secretado pelos osteoblastos maduros, condrócitos hipertrofiados e odontoblastos que são marcadores da fase de mineralização celular. A função ou funções da osteocalcina não estão totalmente esclarecidas, e sua estrutura indica interação com cálcio e com cristais de hidroxiapatita. Adicionalmente, estudos indicam que o aparecimento e aumento de produção da proteína são coincidentes com o início do processo de mineralização. A produção de osteocalcina é considerada um marcador do osteoblasto maduro. A avaliação da osteocalcina intacta realizada no período de 14 dias indicou diferença estatística ($p < 0.05$) com maior produção de osteocalcina pelo grupo L1. Aos 21 dias este comportamento se repetiu sendo que os outros grupos experimentais não tiveram diferença em relação ao grupo controle (Figura 19).

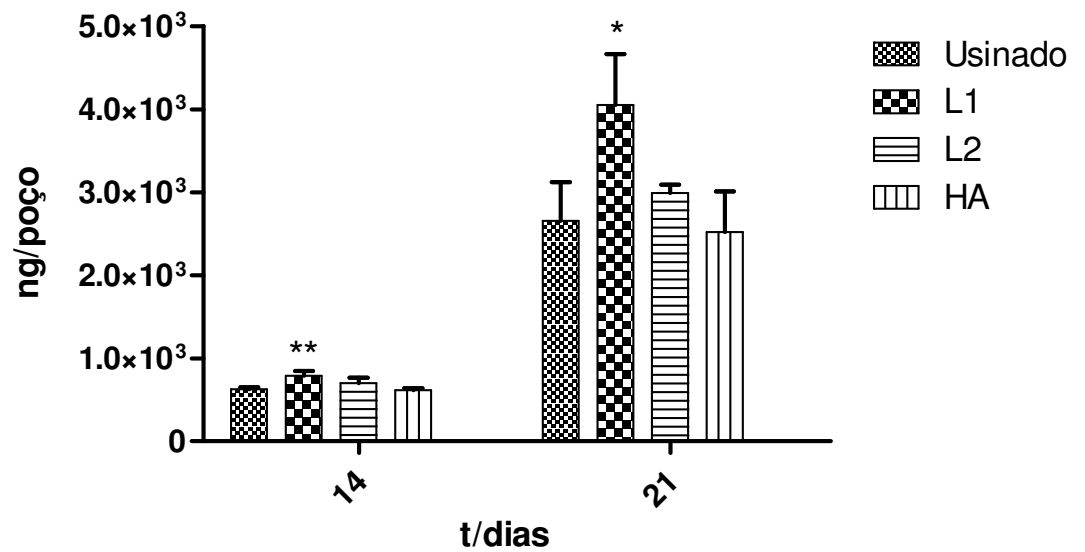


Figura 19. Produção de osteocalcina.

10.6. Resultados MEV-EDS

A análise por MEV das amostras de titânio contendo células aderidas em seus respectivos períodos foi realizada, sendo os campos de interesse documentados por micrografias. Os períodos avaliados foram 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. A morfologia das superfícies e o desenvolvimento das células sobre as amostras estão apresentados nas Figuras 17 a 26. Após a análise das micrografias obtidas por MEV, observou-se a adesão celular após 1 dia. As superfícies do grupo Usinado foram analisadas no modo elétrons retro-espalhados, devido à dificuldade de se obter imagens nítidas de estruturas muito finas (até 6000 x). Após 3 dias (Figura 22) observam-se interligações citoplasmáticas nas superfícies L1 e L2. Entre os dias 7 e 14 houve grande proliferação celular, em menor intensidade no grupo L2 (Figura 21). Observa-se após 21 dias (Figura 25) a camada celular sobre as superfícies, com maior número de espaços remanescentes na superfície L2. aos 28 dias (Figura 26-29).

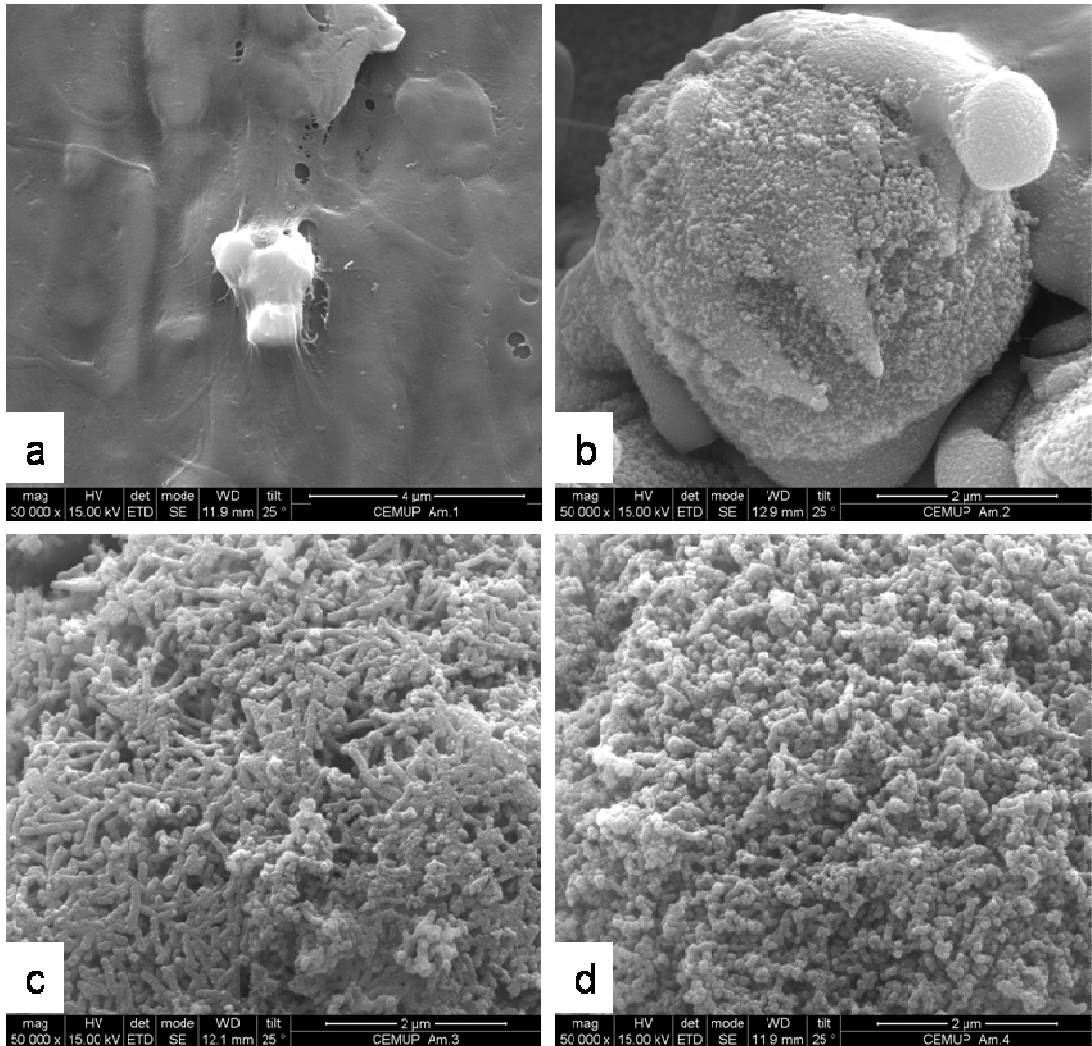


Figura 20. MEV em alta magnificação após 1 dia em cultura, (a) Superfície usada escala 4μm, (b) L1 escala 2μm, (c) L2 escala 2μm e HA escala 2μm.

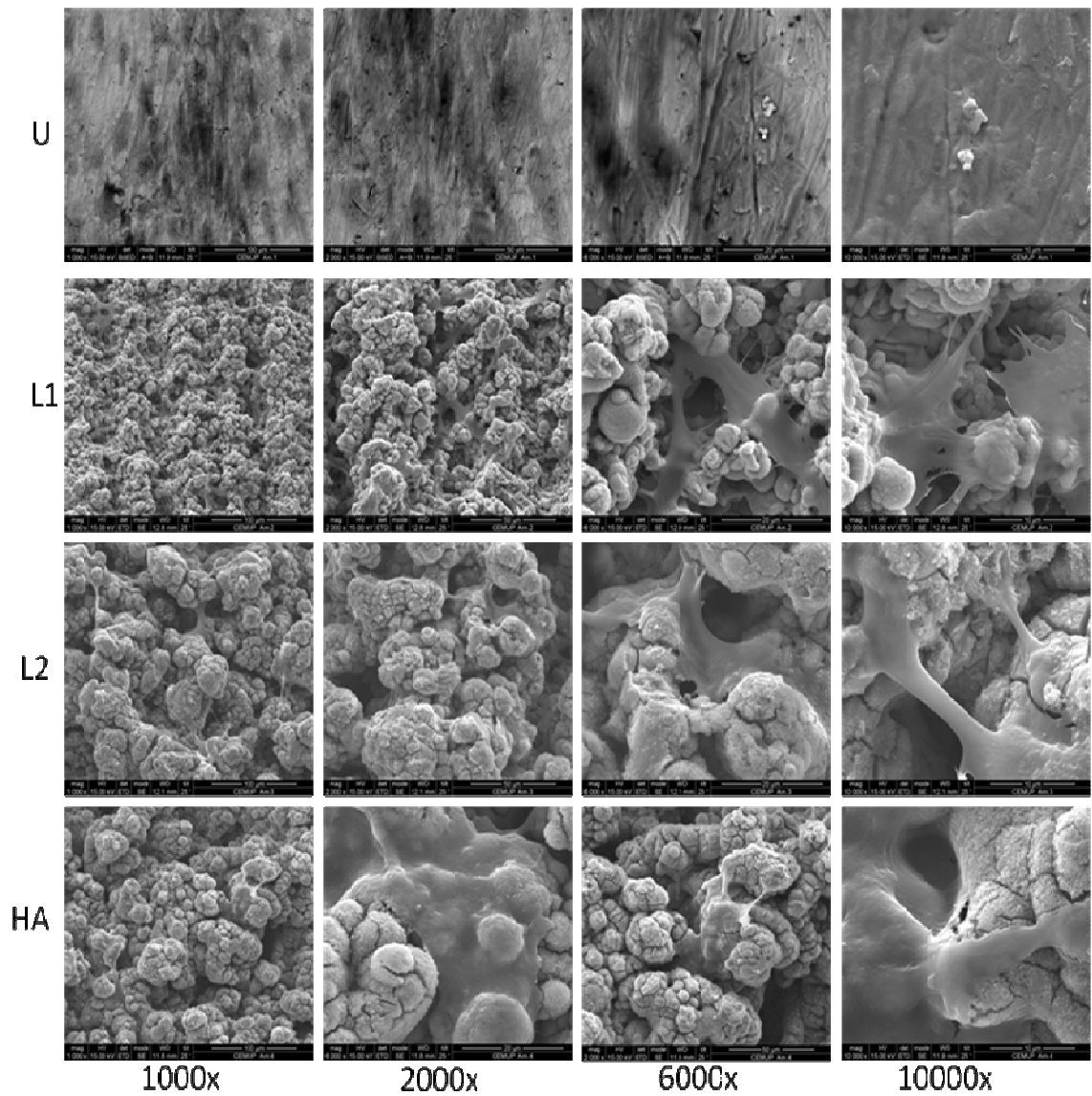


Figura 21. MEV após 1 dia em cultura das superfícies,(U,L1,L2,e HA) e seus respectivos aumentos.

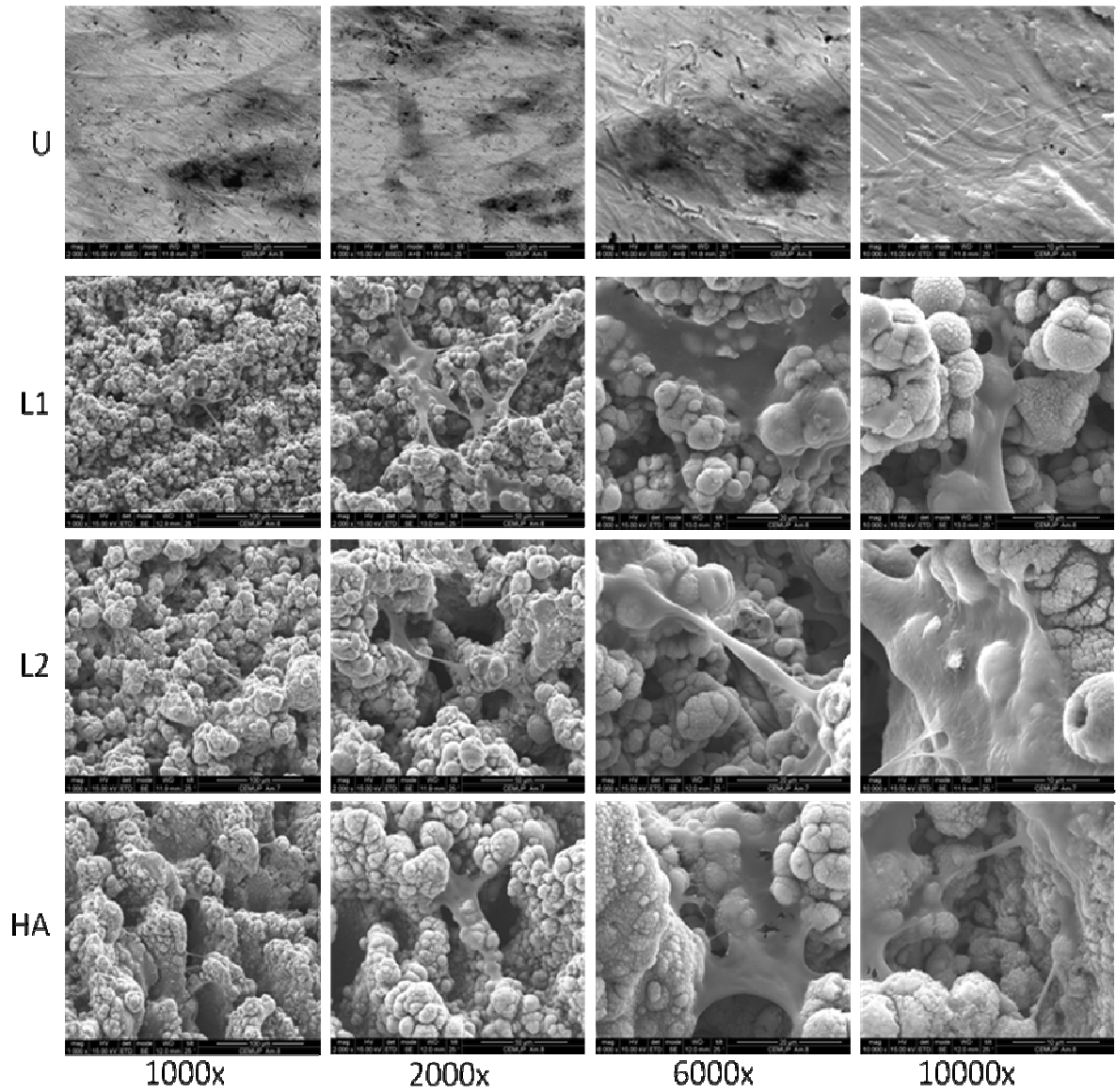


Figura 22. MEV após 3 dias em cultura das superfícies,(U,L1,L2,e HA) e seus respectivos aumentos.

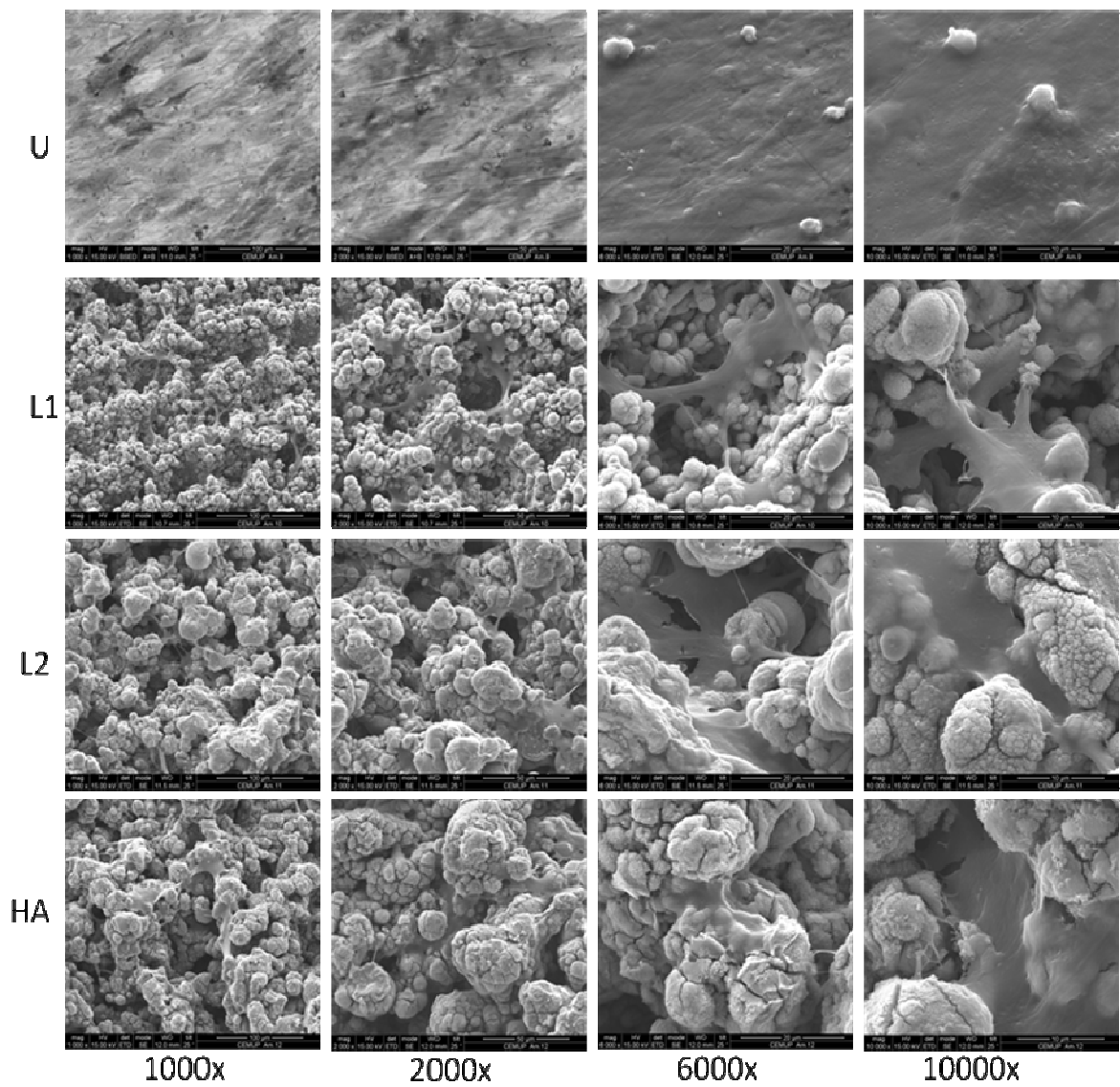


Figura 23. MEV após 7 dias em cultura das superfícies,(U,L1,L2,e HA) e seus respectivos aumentos.

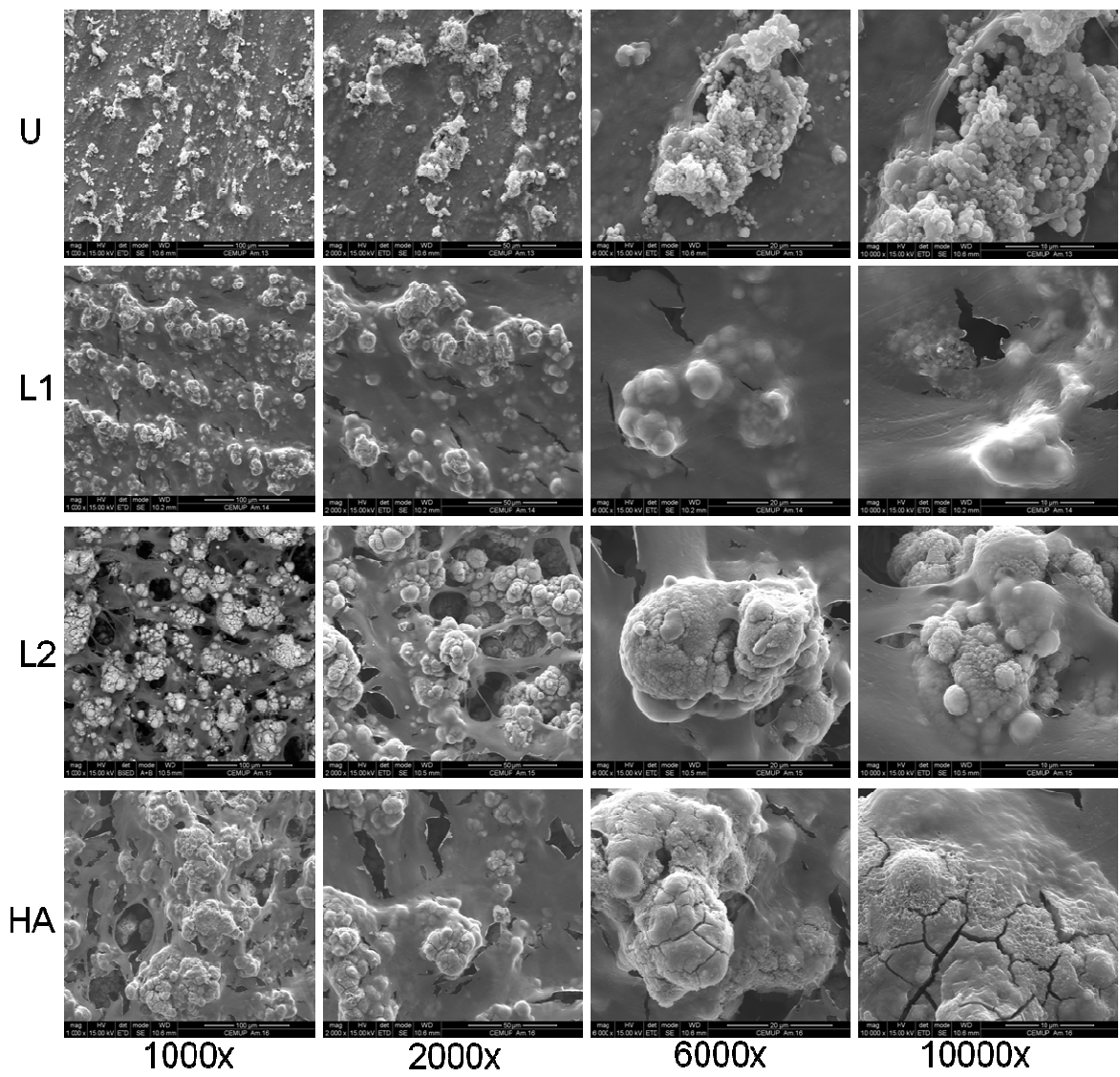


Figura 24. MEV após 14 dias em cultura das superfícies,(U,L1,L2,e HA) e seus respectivos aumentos.

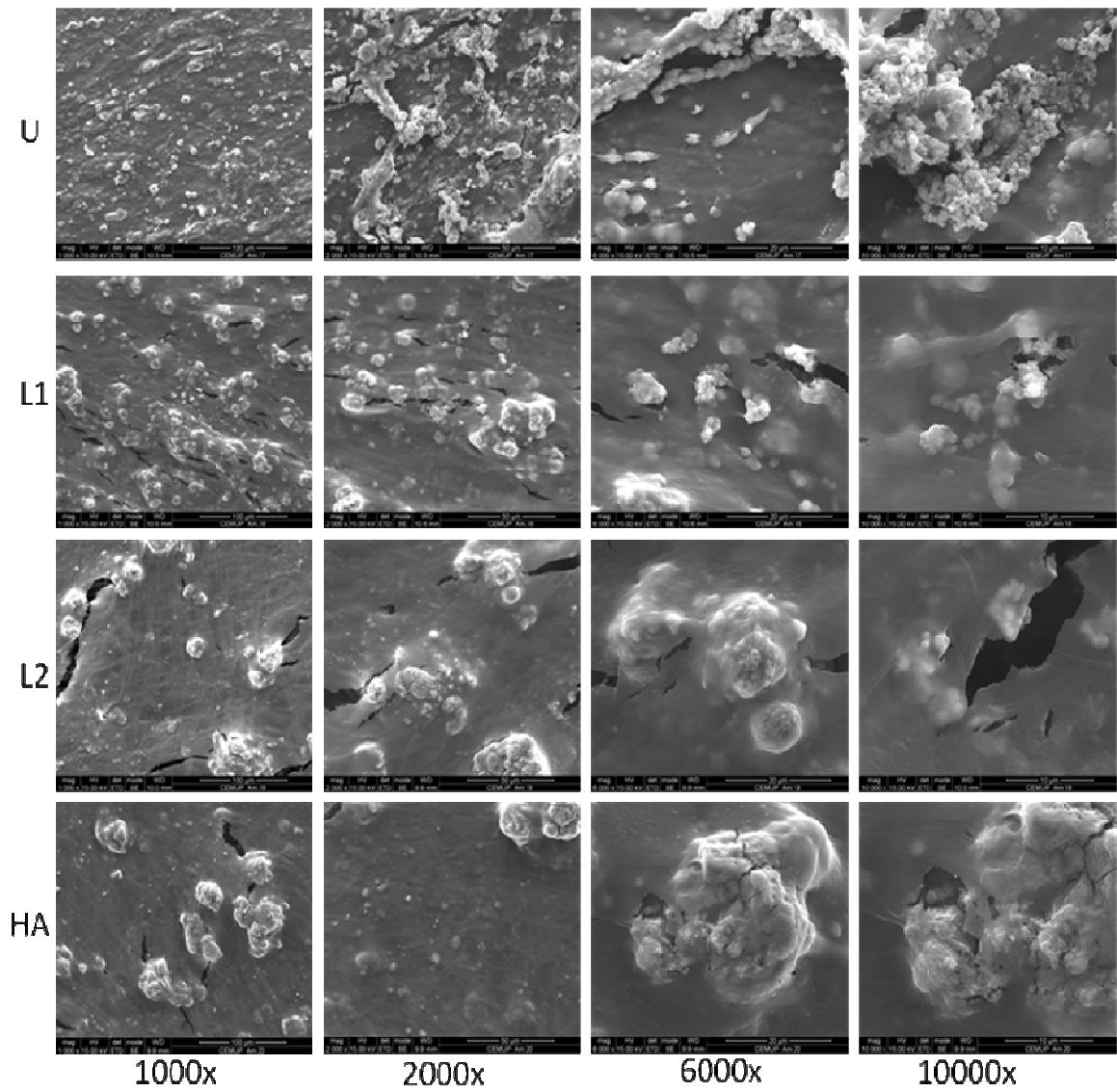


Figura 25. MEV após 21 dias em cultura das superfícies,(U,L1,L2,e HA) e seus respectivos aumentos.

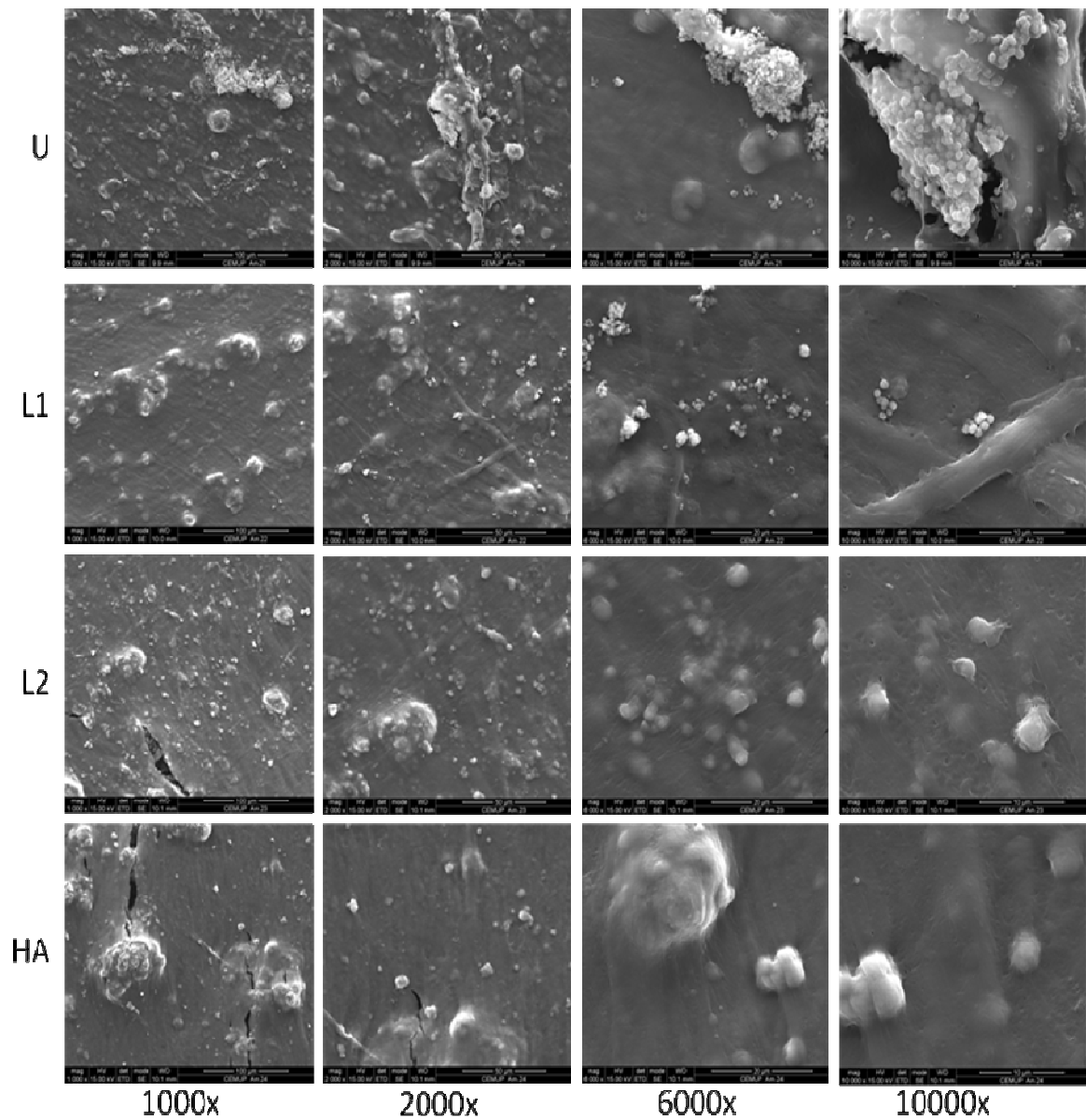


Figura 26. MEV após 28 dias em cultura das superfícies,(U,L1,L2,e HA) e seus respectivos aumentos.

10.7. Resultados: EDS

Os espectros de EDS foram identificados picos de Cálcio e Fósforo no período de 14 dias. Na Figura 27 após a análise em (a) micro análise na superfície

usinada. Nas Figuras (c,d) observa-se picos de Cálcio e Fósforo com intensidade semelhante. Na Figura (c) observou-se menor intensidade dos picos de Cálcio e Fósforo

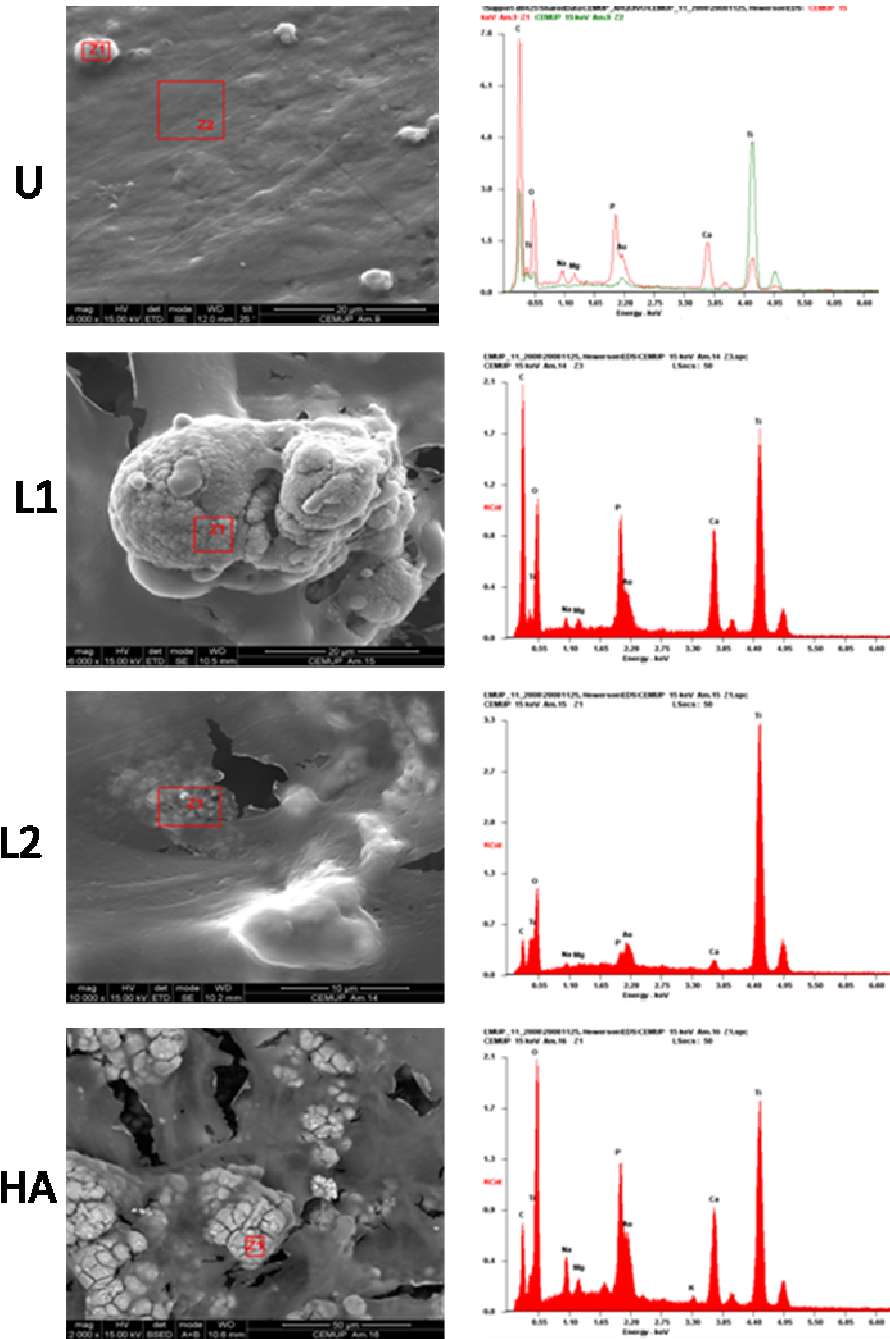


Figura .27. MEV Profiferação celular aos 14 dias ,e seus respectivos EDS

Os espectros de EDS apresentam picos de Cálcio e Fósforo no período de 21 dias.

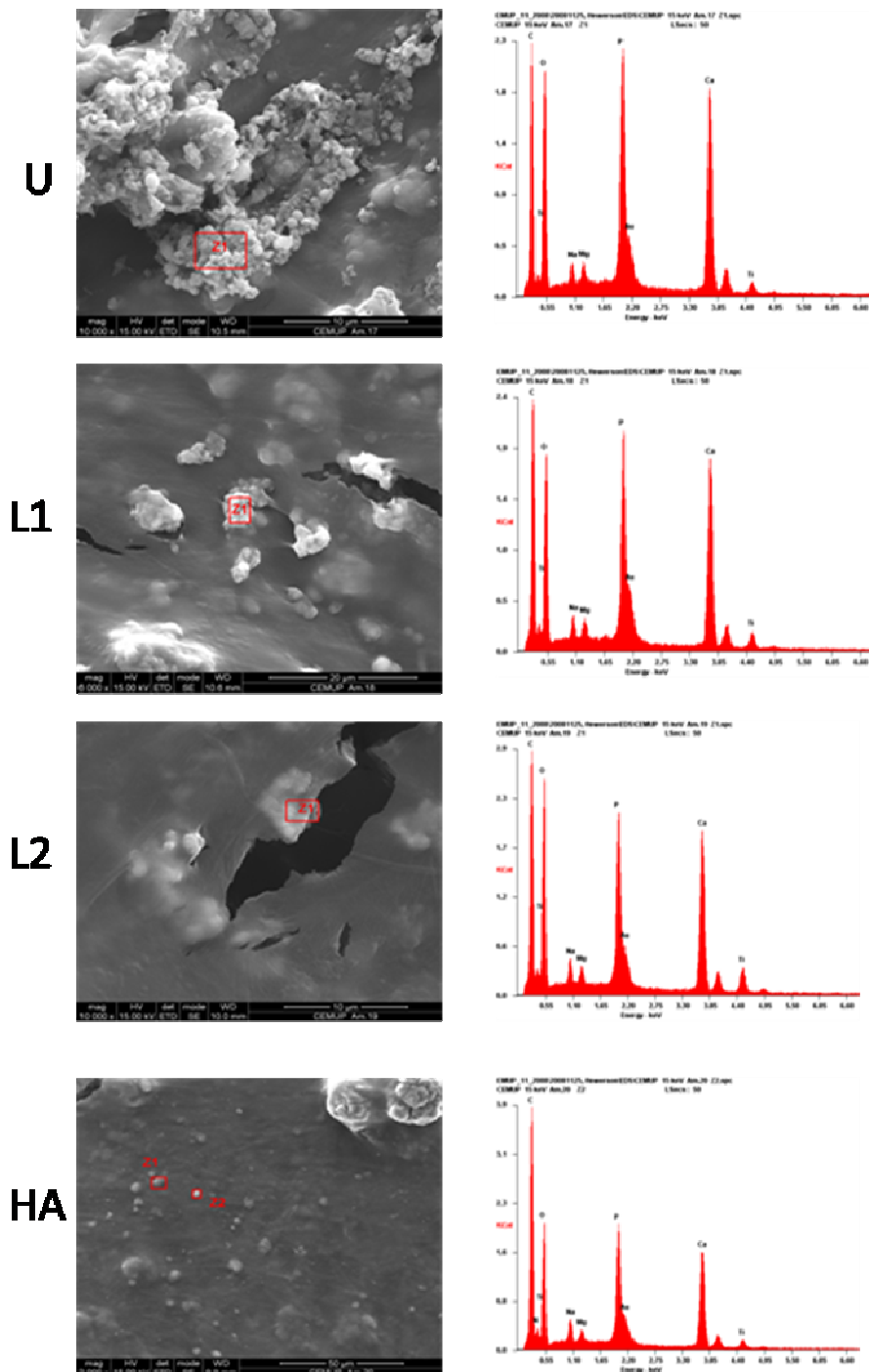


Figura .28. MEV proliferação celular aos 21 dias, à direita seus respectivos EDS.

Na Figura 28 após a micro análise em (a,b,c) foi observada a presença de cálcio e fósforo em todas as superfícies.

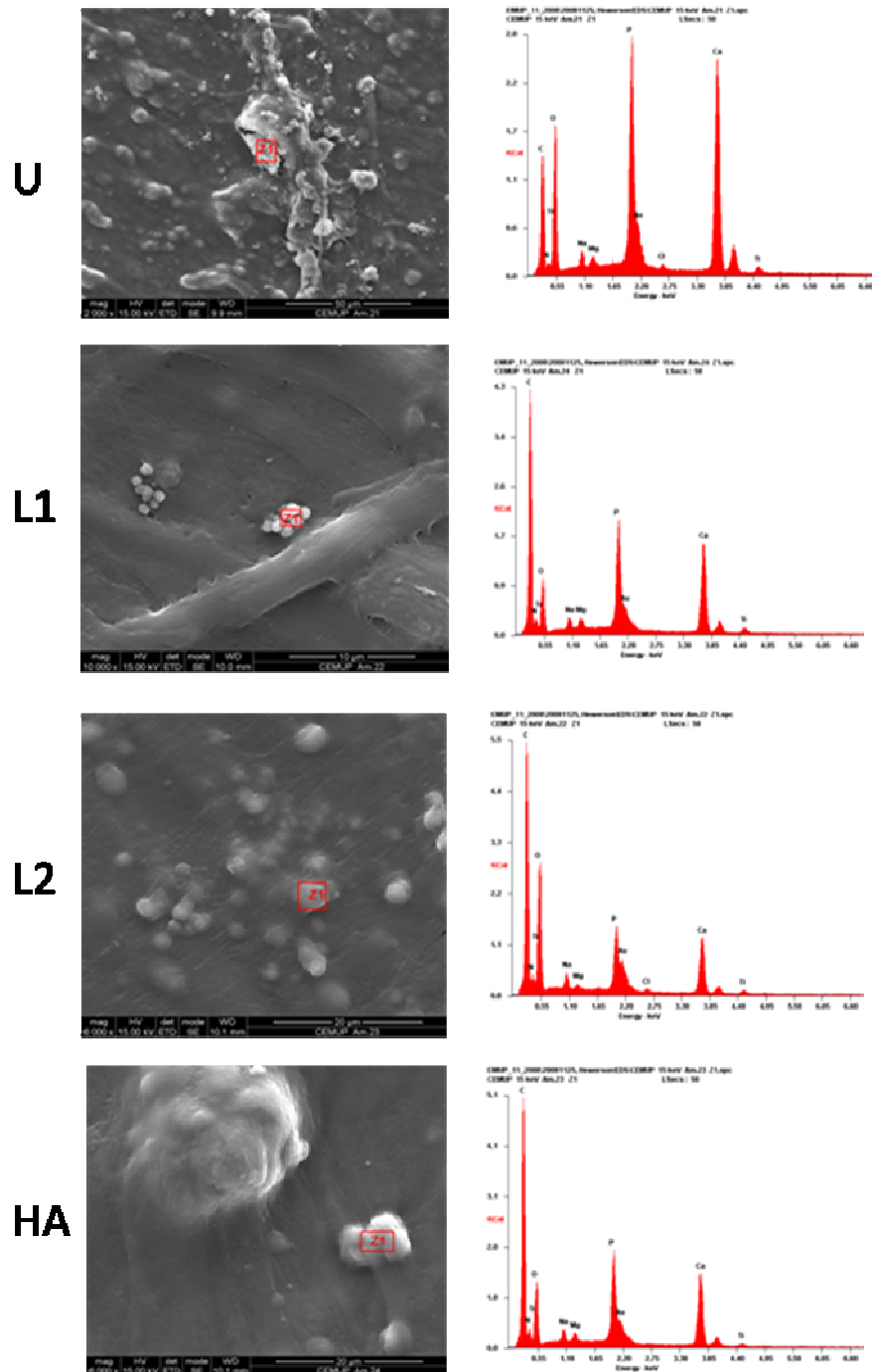


Figura.29. MEV colonização celular aos 28 dias a direita seus respectivos EDS.

Na Figura 29 após a análise em (a,b,c) foi observada a completa colonização celular que preenheu totalmente todas as superfícies. Na Figura 28 após a análise em (a,b,c) foi observada a presença de cálcio e fósforo em todas as superfícies.

10.8. Resultados de Microscopia de Fluorescência - MF

Os períodos de análise por MF foram 1, 3 e 7 dias. Os núcleos celulares foram corados por DAPI em azul e o cito esqueleto por Alexafluor 488 Phalloidin em verde.

A análise após MF apresentam imagens sobre o padrão de adesão e proliferação celulares nas diferentes superfícies (Figura 30). Na micrografia (Figura 30 a,b) observa-se a tendência de alinhamento do citoplasma celular observado em 1 e 3 dias. Na micrografia (Figura 30c) observa-se o padrão de alinhamento celular com cobertura total do substrato aos 7 dias. Nas micrografias L1 (Figura 30 d,e,f) observa-se a proliferação celular no sentido vertical e horizontal, seguindo o padrão morfológico do substrato.

Nas micrografias L2 (Figura 30 g,h,i) observa-se a presença de maiores espaços inter celulares o que pode indicar uma tendência para adesão celular em 3 dimensões, o que fornece indiretamente informações sobre a maior área para proliferação. Nas micrografias HA (Figura 30 j,k,l) observa-se comportamento similar ao do grupo L2. Todos os grupos avaliados apresentaram completa colonização das superfícies pelas células até os 7 dias em cultura.

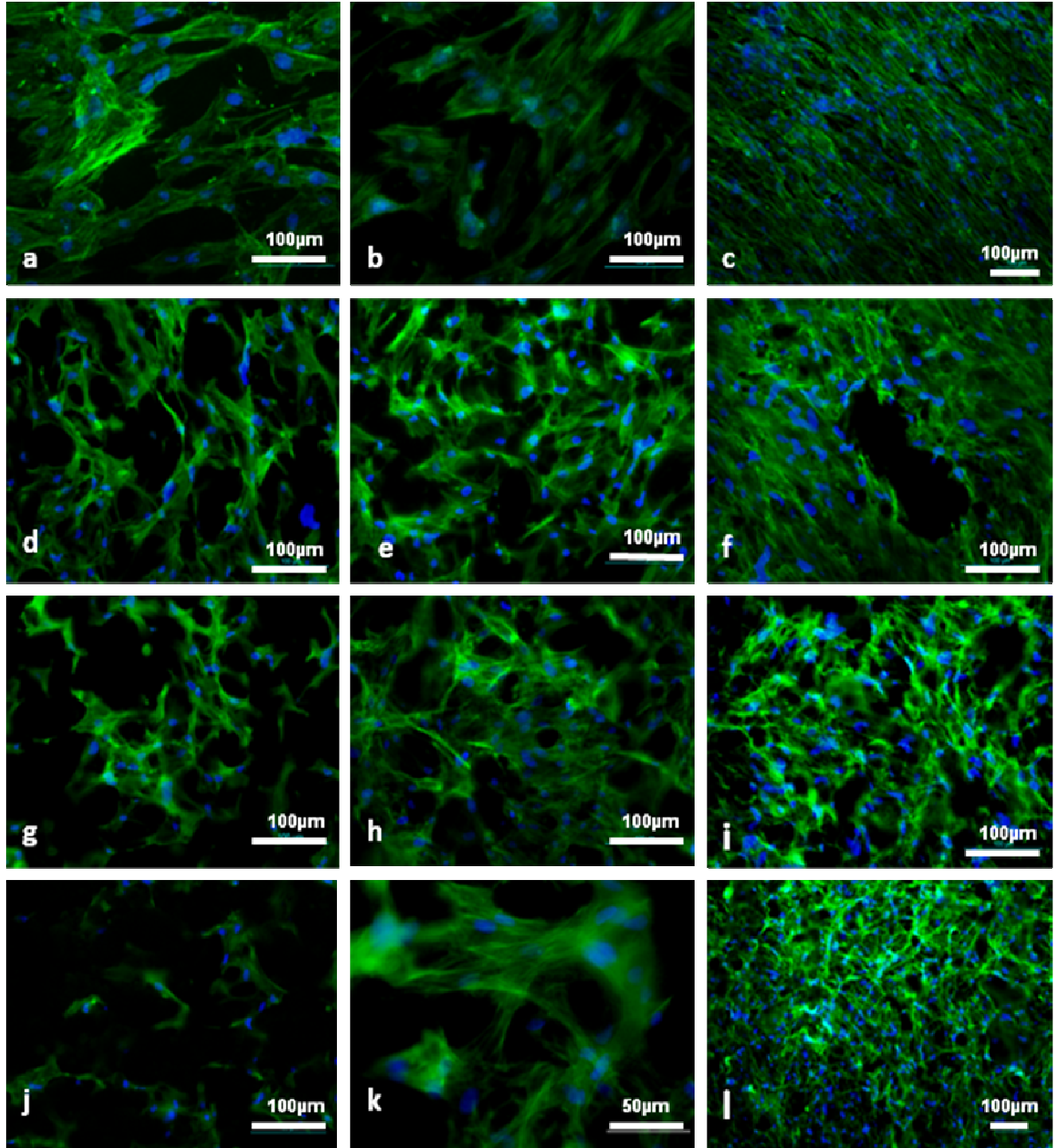


Figura 30. Microscopia de fluorescência superfície Usinada nos períodos (a) 1, (b) 3 e (c) 7 dias; L1 nos períodos (d) 1, (e) 3 e (f) 7 dias; L2 nos períodos (g) 1, (h) 3 e (i) 7 dias; HA nos períodos (j) 1, (k) 3 e (l) 7 dias.

11. Discussão

O objetivo do presente estudo foi avaliar comparativamente a viabilidade, proliferação e diferenciação celular de células estaminais da medula óssea humana quando cultivadas sobre Ti cp em diferentes condições experimentais de irradiação laser e laser associado ao recobrimento de HA. As superfícies experimentais L1 e L2 sofreram modificação físico-químicas e morfológicas sob a ação do feixe de laser e a superfície HA sofreu a mesma modificação físico-química que o grupo L2 com posterior recobrimento de HA. (APARECIDA, 2009) O que apresentou composição semelhante à do tecido ósseo humano com presença de fases de apatitas de grande interesse biológico.

A interação do laser com a superfície de Ti cp em atmosfera ambiente levou à integração de elementos como oxigênio, nitrogênio e carbono que reagem física e quimicamente fora do equilíbrio termodinâmico, ocasionado pelo aquecimento e resfriamento rápidos da superfície. A estrutura cristalina do titânio e apresentou uma mistura de óxidos estequiométricos e não estequiométricos com diferentes morfologias e propriedades. As superfícies do Ti cp avaliadas previamente e apresentadas no Capítulo I objetivaram a seleção dos parâmetros de irradiação preparação e caracterização das superfícies.

A morfologia das superfícies obtidas foi analisada por MEV-EDS constatando o efeito da irradiação como método eficiente, reprodutível, rápido e limpo de se obter micro e nano estruturas de compostos provenientes da interação titânio/laser em atmosfera ambiente. As análises via DRX evidenciaram que as estruturas obtidas continham uma mistura de óxidos de titânio e no grupo HA os grupos fosfatos formados foram analisados por DRX e FTIR após o recobrimento biomimético.

O recobrimento de apatitas foi realizado no intuito de obter uma superfície bioativa, o qual apresentou promissores resultados por avaliações *in vivo* realizados anteriormente (FAEDA, 2009).

O método utilizado para isolar e obter células mesenquimais indiferenciadas seguiu um protocolo descrito por vários autores (AGRAWAL, 2005; ANSELME, 2000; CHAI, 2007; HACKING, 2008; HENDERSON, 2008; MEINEL, 2004). As células utilizadas em todos os experimentos seguiram as normas éticas do laboratório do Centro de Química da Universidade da Madeira em parceria com o Hospital do Funchal .

O metabolismo celular foi avaliado pelo método Alamar Blue que apresenta alta sensibilidade e baseou-se na detecção da atividade metabólica celular no ciclo da respiração celular. É, portanto uma forma indireta de detectar a viabilidade celular em contato com diferentes biomateriais. Após a análise dos dados foi observada maior proliferação celular entre os 7 e 21 dias sobre as superfícies experimentais L1, L2 e HA quando comparados ao controle de superfície Usinada, este fato pode estar relacionado à maior área para proliferação e desenvolvimento celular proporcionada pelas superfícies experimentais.

A adesão e proliferação celulares foram determinadas pela quantificação do DNA das amostras com células viáveis. Os resultados indicaram maior adesão e proliferação para o grupo controle até os 7 dias de avaliação. Aos 14 dias os grupos experimentais L1, L2 e HA apresentaram maior concentração de DNA por amostra quando comparados ao grupo controle ($P < 0.05$) com melhor desempenho para os grupos experimentais em questão.

A diferenciação osteogênica foi avaliada pela associação das informações de concentração da relação ALP/Proteína e níveis de osteocalcina que indicam respectivamente: fases iniciais e fase madura de diferenciação celular óssea. Esses resultados indicaram níveis de ALP/proteína aumentados para o grupo L2 no período de 14 dias quando comparados ao grupo controle ($P < 0.05$), o que pode estar relacionado com a presença de maior quantidade de células em diferenciação osteoblástica. Para o período final de avaliação 21 dias, os dados indicaram maior concentração em todas as amostras experimentais estudadas com forte significância para o grupo HA o que pode indicar relação com a bioatividade do recobrimento (JALOTA, 2007; ZHENG, 2008). Os níveis de osteocalcina analisados no presente trabalho indicaram significativa diferença de concentração entre L1 e controle aos 14 e 21 dias.

Após as análises por MEV-EDS observou-se que as células apresentaram o comportamento de alinhamento do citoplasma em todas as superfícies, entretanto esse padrão facilitou a adesão celular na superfície controle (grupo Usinado) pelo motivo de ser mais fácil proliferar e aderir em superfície plana quando comparado às superfícies experimentais. Portanto os resultados de quantificação de DNA nos períodos iniciais não indicam necessariamente ser melhor o desenvolvimento em superfícies planas. Nos períodos tardios de avaliação (14 e 21 dias) as amostras de superfície usinada não tinham mais espaço para proliferação em comparação com

as superfícies experimentais. Portanto as concentrações de proteínas e enzimas são mais elevados na amostras experimentais quando comparadas ao grupo controle.

Análises por EDS indicaram a presença de Cálcio e Fósforo nas amostras. Inicialmente para os grupos L1 e controle (14 dias). No decorrer dos períodos os espaços criados pela irradiação laser nas superfícies L2 e HA foram gradativamente preenchidos por colônias celulares, que após os 14 dias apresentaram indícios de depósito de matriz mineralizada. Este fato só pode ser considerado para os grupos L1 e L2 em virtude da amostra HA, conter previamente Cálcio e Fósforo na sua superfície. A microscopia de fluorescência forneceu dados sobre o padrão de adesão e proliferação celulares. No grupo usinado as células seguem um alinhamento horizontal que por sua vez induz outras células das imediações a seguirem o mesmo padrão. No grupo L1, L2 e HA a distribuição foi heterogênea e as células dispõem de maior área para proliferar-se, esse fato concorda com os dados de análises bioquímicas obtidas. As respostas celulares na superfície das amostras são cruciais parâmetros para a proliferação, diferenciação e mineralização participando também como parte do processo de regeneração óssea (ANSELME, 2000; BRÅNEMARK, 2001; MÜLLER, 2006)

A ferramenta laser, que foi utilizada para modificar a superfície do titânio mostrou ser um eficiente método para se produzir modificações físico-químicas na superfície do Ti cp (HACKING, 2008), propiciando um nicho adequado para o desenvolvimento celular. As avaliações in vitro apresentadas na segunda parte do presente trabalho participam do desenvolvimento e testes iniciais de dispositivos biocompatíveis, possibilitando ainda estudos como carreadores para sistemas de liberação controlada de drogas ou genes (OLIVEIRA, 2009; SCHLIEPHAKE, 2008; GUO, 2006). Os resultados obtidos são indicativos de que o tratamento de superfície de Ti cp por laser apresenta condições biológicas favoráveis para aplicação e desenvolvimento de dispositivos para aplicação óssea.

12 Conclusão

a) A irradiação laser Yb:YAG é um processo limpo, rápido, reprodutível, e economicamente viável para se obter modificações físico-químicas e morfológicas na superfície do Ti cp.

b) O grupo L1 obteve o melhor desempenho considerando-se as etapas de proliferação e diferenciação celulares.

c) O grupo HA apresentou sinais de bioatividade pelas análises de níveis de ALP/Proteína e metabolismo celular, e pode ser verificado comparando-se as superfícies L2 e HA.

d) Houve diferenciação osteogênica em todos os grupos estudados.

REFERÊNCIAS

ABE, Y. E. A. Apatite coating on ceramics, metals and polymers using a biological process. Journal of Materials Science Materials in Medicine, n. 1, p. 536-540, May 1990.

AGRAWAL, S.; SCHAFFER, D. V. *In situ* stem cell therapy: novel targets, familiar challenges. Trends Biotechnology, v. 23, n. 2, p. 78-83, Feb. 2005.

ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. Oral implant surfaces: Part 2-review focusing on clinical knowledge of different surfaces. International Journal Prosthodontics, v. 17, n. 5. p. 544-564, Sept./Oct. 2004.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. Biomaterials, v. 21, n. 7, p. 667-681, Apr. 2000.

APARECIDA, A. H. et al. Biomimetic apatite formation on Ultra-High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE) using modified biomimetic solution. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, v. 20, n. 6, p.1215-1222, June 2009.

APARECIDA, A. H. Recobrimento de apatitas empregando-se o método biomimético: estudo da influência dos íons K⁺, Mg²⁺, SO₄²⁻ e HCO₃⁻ na formação de hidroxiapatita. 2006. 116 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

BALL, M. D. et al. Osteoblast growth on titanium foils coated with hydroxyapatite by pulsed laser ablation. Biomaterials, v. 22, n. 4, p. 337-347, Feb. 2001.

BELOTI, M. M. et al. The effect of purmorphamine on osteoblast phenotype expression of human bone marrow mesenchymal cells cultured on titanium. Biomaterials, v. 26,n. 20, p. 4245-4248, July 2005.

BELOTI, M. M. et al. *In vitro* osteogenesis induced by cells derived from sites submitted to sinus grafting with anorganic bovine bone. Clinical Oral Implants Research, v. 19, n. 1, p. 48-54, Jan. 2008.

BHARATI, S. et al. Hydroxyapatite coating by biomimetic method on titanium alloy using concentrated SBF. Bulletin of Materials Science, v. 28, n. 6, p. 617-621, Oct. 2005.

BOSKEY, A. L.; ROY, R. Cell culture systems for studies of bone and tooth mineralization. Chemical Reviews, v. 108, n. 11, p. 4716-4733, Nov. 2008.

BOYAN, B. D. et al. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. Biomaterials, v. 17, n. 2, p.137-146, Jan. 1996.

BRAGA, F. J. C. et al. Surface modification of Ti dental implants by Nd: YVO4 laser irradiation. Applied Surface Science, v. 253, n. 23, p. 9203-9208, Sept. 2007.

BRÅNEMARK, R. et al. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation. Journal of Rehabilitation Research & Development , v. 38 n. 2, Mar./Apr. 2001.

BRÅNEMARK, P-I. Osseointegration and its experimental studies. Journal of Prosthetic Dentistry, v. 50, p. 399-410, 1983.

BRUNSKI, J. B. et al. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. International Journal Oral Maxillofacial Implants, v. 15, n. 1, p.15-46, Jan-Feb. 2000.

CHAI, C.; LEONG, K. W. Biomaterials approach to expand and direct differentiation of stem cells. Molecular Therapy, v. 15, n. 3, p. 467-480, Mar. 2007.

CHEN, J. et al. Cell/surface interactions and adhesion on Ti-6Al-4V: effects of surface texture. Journal Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials, v. 82, n. 2, p. 360-373, Aug. 2007.

CHO, S. A.; JUNG, S. K. A removal torque of the laser-treated titanium implants in rabbit tibia. Biomaterials, v. 24, n. 26, p. 4859-4863, Nov. 2003.

CHOU, Y. F. et al. The effect of biomimetic apatite structure on osteoblast viability, proliferation, and gene expression. Biomaterials, v. 26, n. 3, p. 285-295, Jan. 2005.

COMMITTEE FOR POWDER DIFFRACTION STUDIES. Diffraction Data Base. International for Diffraction Data. Newton Square, 2003.

COOPER, L. F. A. et al. Role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. Journal of Prosthetic Dentistry, v. 84, n. 5, p. 522-534, Nov. 2000.

CULLITY, B. D. E. Elements of X-Ray diffraction. 2nd ed. Reading: Addison-Wesley, 1978.

CURRAN, J. M. et al. Controlling the phenotype and function of mesenchymal stem cells *in vitro* by adhesion to silane-modified clean glass surfaces. Biomaterials, v. 26, n. 34, p. 7057-7067, Dec. 2005.

DIETER, G. E. J. Mechanical metallurgy. New York: Mc Graw-Hill, 1961.

EVEN-RAM, S. et al. Matrix control of stem cell fate. Cell, v. 126, n. 4, p. 645-647, Aug. 2006.

FAEDA, R. S. et al. Evaluation of titanium implants with surface modification by laser beam. Biomechanical study in rabbit tibias. Brazilian Oral Research, n. 890, 2009. In press.

GARCIA, A. J.; BOETTIGER, D. Integrin-fibronectin interactions at the cell-material interface: initial integrin binding and signaling. Biomaterials, v. 20, n. 24, p. 2427-2433, Dec. 1999.

GRAF, H. L. et al. Effect of bone sialoprotein and collagen coating on cell attachment to TICER and pure titanium implant surfaces. International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery, v. 37, n. 7, p. 634-640, July 2008.

GUO, T. et al. Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta 1 for chondrocytes proliferation. Biomaterials, v. 27, n. 7, p. 1095-1103, Oct. 2006.

HACKING, S. A. et al. The response of mineralizing culture systems to microtextured and polished titanium surfaces. Journal of Orthopaedic Research, v. 26, n. 10, p.1347-1354, Oct. 2008.

HALLGREN, C. et al. An *in vivo* study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. Biomaterials, v. 24, n. 5, p. 701-710, Feb. 2003.

HENDERSON, J. A. et al. Concurrent differentiation of marrow stromal cells to osteogenic and vasculogenic lineages. Macromolecular Bioscience, v. 8, n. 6, p. 499-507, June 2008.

JALOTA, S. et al. Osteoblast proliferation on neat and apatite-like calcium phosphate-coated titanium foam scaffolds. Materials Science & Engineering C: Biomimetic and Supramolecular Systems, v. 27, n. 3, p. 432-440, Apr. 2007.

JANMEY, P. A.; McCULLOCH, C. A. Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli. Annual Review of Biomedical Engineering, v. 9, p. 1-34, 2007.

JAZEDJE, T. et al. Stem cells from umbilical cord blood do have myogenic potential, with and without differentiation induction *in vitro*. Journal of Translational Medicine, v. 7, p. 14, Jan. 2009.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biornaterial scaffolds and osteogenesis. Biomaterials, v. 26, n. 27, p. 5474-5491, Sept. 2005.

KENNEDY, S. B. et al. Combinatorial screen of the effect of surface energy on fibronectin-mediated osteoblast adhesion, spreading and proliferation. Biomaterials, v. 27, n. 20, p. 3817-3824, July 2006.

KHADRA, M. et al. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. Biomaterials, v. 26, n. 17, p. 3503-3509, June 2005.

LI, J. P. et al. Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition. Biomaterials, v. 28, n. 18, p. 2810-2820, June 2007.

LI, L. H. et al. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. Biomaterials, v. 25, n. 14, p. 2867-2875, June 2004.

LI, M. et al. High-temperature oxidation resistance improvement of titanium using laser-surface alloying. Journal of Materials Science, v. 30, n. 20, p. 5093-5098, Oct. 1995.

MASTROGIACOMO, M. et al. Bone and cartilage formation by skeletal muscle derived cells. Journal of Cellular Physiology, v. 204, n. 2, p. 594-603, Aug. 2005.

MEINEL, L. et al. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. Annals of Biomedical Engineering, v. 32, n. 1, p. 112-122, Jan. 2004.

MÜLLER, U. et al. Do human osteoblasts grow into open-porous titanium?. European Cells and Materials, v. 11, p. 8-15, 2006.

OLIVEIRA, P. T. et al. Effects of a mixture of growth factors and proteins on the development of the osteogenic phenotype in human alveolar bone cell cultures. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, v. 56, n. 7, p. 629-638, July 2008.

OLIVEIRA, J. M. et al. The osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells cultured with dexamethasone-loaded carboxymethylchitosan/poly(amidoamine) dendrimer nanoparticles. Biomaterials, v. 30, n. 5, p. 804-813, Feb. 2009.

PARK, J. B. L. Biomaterials an introduction. New York: Plenum Press, 1992.

PETO, G. et al. Surface treatment of screw shaped titanium dental implants by high intensity laser pulses. Applied Surface Science, v. 186, n. 1-4, p. 7-13, Jan. 2002.

PROTIVINSKY, J. et al. Effect of chemically modified titanium surfaces on protein adsorption and osteoblast precursor cell behavior. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, v. 22, n. 4, p. 542-550, July-Aug. 2007.

PULEO, D. A.; NANJI, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. Biomaterials, v. 20, n. 23-24, p. 2311-2321, Dec. 1999.

ROMPEN, E. et al. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review. Clinical Oral Implants Research, v. 17, p. 55-67, Oct. 2006.

ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. Clinical Oral Implants Research, v. 14, n. 1, p. 43-49, Feb. 2003a.

ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. TAK-778 enhances osteoblast differentiation of human bone marrow cells. Journal of Cellular Biochemistry, v. 89, n. 6, 15, p. 1148-1153, Aug. 2003b.

RUPP, F. et al. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. Biomaterials, v. 25, n. 7-8, p. 1429-1438, Mar-Apr. 2004.

RYAN, G. E. et al. Porous titanium scaffolds fabricated using a rapid prototyping and powder metallurgy technique. Biomaterials, v. 29, n. 27, p. 3625-3635, Sept. 2008.

SARGEANT, T. D. et al. Hybrid bone implants: self-assembly of peptide amphiphile nanofibers within porous titanium. Biomaterials, v. 29, n. 2, p. 161-171, Jan. 2008.

SCHLIEPHAKE, H.; SCHARNWEBER, D. Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. Journal of Materials Chemistry, v. 18, n. 21, p. 2404-2414, Jun. 2008.

SCHWARTZ, J. et al. Cell attachment and spreading on metal implant materials. Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems, v. 23, n. 3, p. 395-400, Mar. 2003.

SETO, T. et al. Evaluation of morphology and size distribution of silicon and titanium oxide nanoparticles generated by laser ablation. Journal of Nanoparticle Research, v. 3, n. 2-3, p. 185-191, June 2001.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SUN, H. L. et al. Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells on akermanite-bioactive ceramics. Biomaterials, v. 27, n. 33, p. 5651-5657, Nov. 2006.

TALLHEDEN, T. et al. Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. Arthritis Research & Therapy, v. 7, n. 3, p. 560-568, 2005.

TAVARES, H. S. et al. SEM-EDS and biomechanical evaluation of implants with different surface treatments: an initial study. Journal of Osseointegration, v. 1, n. 1, p. 25-33, Apr. 2009.

TAVARES, H. S. et al. Modificações de superfície de implante irradiados por feixe de laser Nd-Yag. In: ENCONTRO DO GRUPO BRASILEIRO DE MATERIAIS DENTÁRIOS, 41., 2005, Florianópolis. Anais... Florianópolis, 2005.

TAVARES, H. S. CQM Report. 24 f. (Relatório Técnico) - Madeira University, Funchal, 2009.

TRAINI, T. et al. Direct laser metal sintering as a new approach to fabrication of an isoelastic functionally graded material for manufacture of porous titanium dental implants. Dental Materials, v. 24, n. 11, p. 1525-1533, Nov. 2008.

ULLMANN, M. et al. Nanoparticle formation by laser ablation. Journal of Nanoparticle Research, v. 4, n. 6, p. 499-509, Dec. 2002.

VALARMATHI, M. T. et al. The influence of proepicardial cells on the osteogenic potential of marrow stromal cells in a three-dimensional tubular scaffold. Biomaterials, v. 29, n. 14, p. 2203-2216, May 2008.

WENNERBERG, A. et al. Titanium release from implants prepared with different surface roughness. Clinical Oral Implants Research, v. 15, n. 5, p. 505-512, Oct. 2004.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials, v. 29, n. 20, p. 2941-2953, July 2008.

XAVIER, S. P. et al. Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. Journal of Dentistry, v. 31, n. 3, p. 173-180, Mar. 2003.

YONGGANG, Y. et al. The influence of discharge power and heat treatment on calcium phosphate coatings prepared by RF magnetron sputtering deposition. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, v. 18, n. 6, p.1061-1069, June 2007.

ZHANG, L. J. et al. Biomimetic helical rosette nanotubes and nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium for improving orthopedic implants. International Journal of Nanomedicine, v. 3, n. 3, p. 323-333, 2008.

ZHAO, G. et al. Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. Biomaterials, v. 28, n. 18, p. 2821-2829, June 2007.

ZHAO, G. et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. Journal of Biomedical Materials Research Part A, v. 74A, n. 1, p. 49-58, July 2005.

ZHENG, M. et al. Microstructure and osteoblast response of gradient bioceramic coating on titanium alloy fabricated by laser cladding. Applied Surface Science, v. 255, n. 2, p. 426-428, Nov. 2008.

ZINGER, O. et al. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. Biomaterials, v. 25, n. 14, p. 2695-2711, June 2004.

ANEXOS



REGIÃO AUTÓNOMA DA MADEIRA
SERVIÇO DE SAÚDE DA REGIÃO AUTÓNOMA DA MADEIRA, E.P.E.

C/C
Direcção Clínica da Área Hospitalar

Serviço Regional de Saúde, E.P.E

SAÍDA
S.0810081 / 5 2008/07/25

Exm^a. Senhora
Dra. Helena Tomás
Investigadora Sénior, PhD
Centro Química da Madeira
Campus da Penteadá
9000-390 FUNCHAL

Sua referência

Sua comunicação

N/Ofício

**Assunto: PROJECTO RELACIONADO COM TECIDO ÓSSEO – TESTES
CELULARES *IN VITRO***

Relativamente ao pedido de autorização sobre o assunto mencionado em epígrafe, a fim de permitir a realização de trabalhos visando o desenvolvimento de novos materiais para aplicação na área da saúde, nomeadamente, projectos relacionados com o tecido ósseo, no âmbito de um estudo de investigação informo V. Ex^a. que o mesmo foi autorizado pelo Conselho de Administração em 24.07.2008, após parecer da Comissão de Ética para a Saúde, desde que sejam observadas as condições que constam no parecer, do qual se junta fotocópia.

Com os melhores cumprimentos.

O Presidente do Conselho de Administração

António Almada Cardoso



REGIÃO AUTÓNOMA DA MADEIRA
SERVIÇO DE SAÚDE DA REGIÃO AUTÓNOMA DA MADEIRA, E.P.E.



Comissão de Ética para a Saúde
do
Hospital Central do Funchal

Parecer nº 45/08



AO CA
de = comiss
de C. Ética
o DC C. Ética

O Pedido:

Recebido da Direcção Clínica para parecer, pedido da Doutora Helena Tomás, Investigadora Sénior do Centro de Química da Madeira, a solicitar apoio na obtenção de amostras de medula óssea humana ou osso trabecular humano, para levar a cabo testes celulares *in vitro*, a fim de permitir a realização de trabalhos visando o desenvolvimento de novos materiais para aplicação na área da Saúde, nomeadamente, projectos relacionados com o tecido ósseo.

Parecer:

A CES/SRS,EPE, organizada e a funcionar de acordo com os requisitos das Normas da Boa Prática Clínica (*ICHGCP Guidelines*) e da legislação nacional em vigor (Dec. Lei nº 97/95, de 10 de Maio), composta por Dr. Edward Richard Maul, Médico e Presidente, Dr. Ricardo Jorge Santos, Médico, Dr. Miguel Pestana, Médico, Dr. Sílvio Sousa, Juiz Desembargador, Dr. José Manuel Freitas, Teólogo, e Enfermeira Isabel Santos, na sua reunião de 07 de Julho de 2008, decidiu por unanimidade que o pedido acima identificado não coloca qualquer problema de ordem ética desde que sejam observadas as seguintes condições:

- Salvaguarda do sigilo quanto à identificação da origem do tecido (tanto no que se refere ao Indivíduo como à Instituição);
- O produto colhido só poderá ser utilizado para a finalidade solicitada (testes celulares *in vitro*);
- O produto colhido só poderá ser o excedente da intervenção (revisão da prótese e / ou retirada do




REGIÃO AUTÓNOMA DA MADEIRA
SERVIÇO DE SAÚDE DA REGIÃO AUTÓNOMA DA MADEIRA, E.P.E.

material da osteosíntese) e que normalmente seria depois rejeitado, não podendo nunca ser aproveitada a intervenção para a colheita activa no doente de medula óssea ou osso trabecular;
d) Para todo este processo é indispensável a obtenção do consentimento informado do doente.

Funchal, 14 de Julho de 2008

O Presidente da CES


(Edward Richard Maul)

Unesp- Araraquara, SP, Brazil

¹Doctoral student in Biotechnology, Biomaterials Group

²Doctoral student in Periodontics

³Associate Professor of Physical Chemistry, Biomaterials Group

⁴Surgeon Dentistry, Biomaterials Group

⁵PhD in Chemistry, Biomaterials Group

⁶Associate Professor of Periodontics

SEM-EDS and biomechanical evaluation of implants with different surface treatments: an initial study

ABSTRACT

Aim Alterations in implant surfaces can affect peri-implant bone formation and shorten the healing time. The goal of the present study was a comparative scanning electron microscopy (SEM)/energy dispersive spectrometry (EDS) and biomechanical evaluation of implants subjected to different surface treatments.

Materials and Methods Four implant surfaces were analyzed in the present study: machined commercial implants (TU); porous-surfaced commercial implants blasted with Al₂O₃ microspheres and acid-etched (TJA); laser beam-irradiated experimental implants (Laser) and laser beam-irradiated experimental implants with hydroxyapatite coating (HA). One sample for each surface underwent pre-surgery SEM / EDS analysis. Thirty-two implants (8 for each surface treatment) were then inserted into the tibia of 4 rabbits. After 8 weeks, the animals were euthanized and the implants retrieved by reverse torque and processed for post-surgery SEM / EDS analysis.

Results HA implants presented higher removal torque values when compared to Laser, TJA and TU groups. Post-surgery SEM micrographs clearly showed bone formation on all the examined surfaces; however, in the TU group bone covered only some areas of the implant surface, while in TJA, Laser and HA groups the entire implant surfaces were overlaid by newly formed bone. EDS analysis supported the results obtained by SEM and removal torque, showing that concentration of Ca and P increased from TU to TJA, Laser and HA implants.

Conclusions Implants with surfaces modified by laser beam with or without apatite coating showed more promising results.

Keywords Bone, Implant surface, Laser, SEM, Titanium.

INTRODUCTION

In recent years, different implant surfaces have been introduced to improve the formation of peri-implant bone and to shorten the healing time (1). The most important properties of implant surfaces are: topography, chemistry, surface charge, and wettability (2).

Microtopography has been demonstrated to be important in the bone formation process, and a higher percentage of bone-implant contact has been reported for rougher surfaces (3). In a rabbit study by Albrektsson and Wennerberg (4) it was observed that after a 4 weeks healing period, the bone volume around rough-surfaced implants was greater than in machined ones, due to a better remodeling activity at the bone-implant interface. Similar results were also reported by Zechner et al. (5) after 6, 8, and 12 weeks of contact-surface healing between implant and bone. Cho and Jung (6), evaluated the importance of different textures for machined and laser-modified implants in a rabbit tibia model. After a 8 weeks healing period, the implants were removed by reverse torque and it was found a torque value of 62.57 Ncm for