

RODRIGO DIAS NASCIMENTO

**OSTEOGÊNESE *IN VITRO* EM AMOSTRAS DE TITÂNIO
COM DIFERENTES POROSIDADES**



2009

RODRIGO DIAS NASCIMENTO

**OSTEOGÊNESE *IN VITRO* EM AMOSTRAS DE TITÂNIO COM
DIFERENTES POROSIDADES**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Neves Jardimi

São José dos Campos

2009

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2008.

N17o Nascimento, Rodrigo Dias.
Osteogênese in vitro em amostras de titânio com diferente porosidades /
Rodrigo Dias Nascimento. __ São José dos Campos : [s.n.], 2009.
87.f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São
José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2009.
Orientador: Prof. Dra. Maria Aparecida Neves Jardim

1. Implantes. 2. Titânio. 3. Superfície Porosa. 4. Osteogênese. 5. Cultura de
células I. Jardim, Maria Aparecida Neves. II. Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

tD74

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 29 de Maio de 2009 .

Assinatura :

E-mail: nascimentodr@yahoo.com.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Aparecida Neves Jardim (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves Cairo

Divisão de Materiais do Instituto de Aeronáutica e Espaço – IAE
Comando Geral de Tecnologia Aeroespacial

Prof. Dr. Caio Gorgulho Zanet

Curso de Odontologia
Universidade Ibirapuera – SP

Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Dr. Fernando Vagner Raldi

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

São José dos Campos, 27 de abril de 2009.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **José Rosendo e Palmira** pela dedicação, amor e esforço imensuráveis para que eu e meu irmão pudéssemos alcançar nossos objetivos. Agradeço muito a DEUS por ter vocês, pessoas que são exemplos de doação, dignidade, honestidade e amor.*

*Ao meu irmão **Thiago**, cirurgião-dentista como eu e exemplo de dedicação. Muito obrigado pelo apoio, ajuda e carinho. Saiba que sempre estaremos juntos superando todas as dificuldades.*

*À minha amada esposa e mamãe, **Paula Elaine**, por continuar tendo enorme paciência, apoio, amor e carinho. Meu amor, esta etapa não poderia ser vencida sem você.*

*Aos meus filhos, **Lucca Gustavo e Gabriela Elaine**, pela ternura, amor e carinho incondicionais. Com certeza, eu e a mamãe não teríamos esta vontade de buscar algo melhor sem ter vocês como principal estímulo. Vocês são nossas maiores dádivas. Amamos muito vocês.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*A **DEUS**, pelo discernimento em optar pelo caminho correto, pela força, saúde e perseverança para encarar e superar os momentos difíceis em mais esta etapa.*

*À **Profª Drª. Maria Aparecida Neves Jardim** por continuar a me orientar no doutorado, permitindo que eu tivesse liberdade em escolher o tema da pesquisa e desenvolvê-lo, porém sem deixar de auxiliar-me. Muito obrigado por me dar o suporte adequado na execução do trabalho, pela paciência e por acreditar em mim.*

*Á **Profª Drª. Luana Marotta Reis de Vasconcellos**, exemplo de dedicação e competência, pela grande colaboração na execução deste trabalho.*

*Á **Profª Drª. Luciane Dias de Oliveira**, pela colaboração e orientação na fase dos experimentos in vitro .*

*Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Alves Cairo**, do Departamento de Materiais do Instituto de Ar e Espaço no CTA ,por disponibilizar o material e equipamento necessários para confecção das amostras .*

*Ao **Prof. Tit. José Roberto Sá Lima**, da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP , meu pai acadêmico e grande amigo, pelo constante incentivo na busca de conhecimento e de meus objetivos.*

*Ao **Prof. Dr. Fernando Vagner Raldi**, da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP, pessoa de grande valor e importância para mim durante a graduação e a pós-graduação. Agradeço pelos conselhos e incentivos nas horas difíceis, pelas oportunidades oferecidas e pela amizade.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, representada pelo Diretor, **Prof. Adj. José Roberto Rodrigues**, por possibilitar a realização deste Doutorado e à **FUNDUNESP** pelo apoio financeiro.

Ao **Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal**, pela oportunidade de realização do curso.

À **Profª Adj. Yasmim Rodarte Carvalho**, pelo auxílio durante a realização do trabalho.

À **Profª Adj Rosilene Fernandes da Rocha**, pelo carinho com que sempre me tratou, sendo sempre solícita em me auxiliar nas dificuldades.

Ao **Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge**, por ceder as instalações do Laboratório de Cultura de Células para a realização da pesquisa.

Ao **Prof. Ivan Balducci**, pela colaboração nas análises estatísticas e desenvolvimento dos gráficos .

À **Profª Drª Mônica Fernandes Gomes**, pelo auxílio nas dificuldades.

À **Profª Drª Adriana Aigotti Haberbeck Brandão**, pelas inúmeras vezes em que sanou minhas dúvidas e pela paciência.

À secretária **Sílvia Scarpel**, pelo auxílio em todas as dúvidas.

Aos funcionários do Biotério, **Lourival Jacob, Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos e Marco**, pela colaboração na fase experimental desta pesquisa.

Aos técnicos **Sérgio e Domingos**, pela imensa colaboração nas etapas laboratoriais.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação, **Rosemary da Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa e Maria Aparecida Consiglio de Souza**, pela atenção e auxílio.

A aluna de graduação, **Evelyn**, pela colaboração na elaboração deste trabalho.

A todos os colegas do Programa de Pós-graduação, pelo convívio e pelas inúmeras colaborações neste estudo.

À **Stela e Márcia**, da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, pelo carinho com que sempre me trataram, pela paciência e incentivo.

Aos Professores da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP, **Marcelo Marotta Araújo, Paulo Villela Santos Júnior, Antonino Kimaid e Eduvaldo Silvino B. Marques**, pelos incentivos e auxílios dados desde a graduação.

Ao amigo **João Teixeira Varandas**, pela cumplicidade e incentivo.

A todos, que direta ou indiretamente, participaram e auxiliaram a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Biomateriais e biocompatibilidade.....	14
2.2 Técnica de obtenção da porosidade em metais utilizados como implantes.....	17
2.3 Estudos sobre modificações na superfície de implantes osseointegrados.....	21
3 PROPOSIÇÃO.....	29
4 MATERIAIS E MÉTODO.....	30
4.1 Amostras de titânio.....	30
4.2 Análise metalográfica.....	34
4.3 Procedimentos de cultura celular.....	34
4.3.1 Isolamento de células da linhagem osteoblástica e desenvolvimento de cultura primária osteogênica.....	34
4.3.2 Adesão celular	37
4.3.3 Proliferação e viabilidade celular.....	38
4.3.4 Conteúdo de proteína total.....	39
4.3.5 Atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	40
4.3.6 Quantificação de formações nodulares de matriz mineralizada.....	42
4.4 Delineamento experimental e análise estatística.....	44
5 RESULTADOS.....	45
6 DISCUSSÃO.....	64
7 CONCLUSÃO.....	73
6 REFERÊNCIA.....	74
APÊNDICE.....	84
ANEXOS.....	86
ABSTRACT.....	87

Nascimento RD. Osteogênese *in vitro* em amostras de titânio com diferentes porosidades [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2009.

RESUMO

Alterações nas propriedades físicas e químicas na superfície do titânio (Ti) buscam acelerar e melhorar a osseointegração. Além disso, a criação de substratos porosos, além de beneficiar fenômenos celulares, propiciaria uma maior resistência mecânica na interface osseointegrada devido ao crescimento de tecido ósseo para o interior dos poros. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da porosidade de amostras de Ti na osteogênese *in vitro* em amostras de titânio. Foram confeccionadas por metalurgia do pó, discos de titânio puro grau 2 com 12 mm de diâmetro e 3 mm de altura, que foram divididos em três grupos: a) G1: controle - titânio denso; b) G2: 30% de porosidade e poros com 300 µm; c) G3: 40% de porosidade e poros com 300 µm. Inicialmente, a superfície de 03 espécimes de cada grupo foi caracterizada por meio de análise metalográfica, visando confirmar a quantidade, área, morfologia e interligação dos poros. Para a realização da pesquisa, células osteogênicas obtidas da calvária de ratos recém-nascidos foram cultivadas sobre as amostras de cada grupo e avaliadas quanto à adesão celular, após 24 horas, proliferação e viabilidade celular, após 7, 10 e 14 dias. A diferenciação celular foi avaliada através da mensuração do conteúdo de proteína total, atividade da fosfatase alcalina e formação de matriz nodular mineralizada nos períodos de 7, 10 e 14 dias. Os resultados obtidos com os testes ANOVA e Tukey (5%) indicaram que houve adesão celular em todas as superfícies e que esta não interferiu nos resultados. As superfícies porosas (G2 e G3) favoreceram a proliferação celular quando comparadas as superfícies densas. O conteúdo de proteína total e a formação de matriz mineralizada foram significativamente maiores nas amostras de G3. Entretanto, não houve diferença estatística nos valores da atividade da fosfatase alcalina. Esses resultados sugerem uma correlação positiva entre a topografia de superfície das amostras e os fenômenos de adesão, proliferação e diferenciação celular.

Palavras-chave: Implantes. Titânio. Superfície porosa. Osteogênese. Cultura de células.

1 INTRODUÇÃO

Com os estudos realizados por Brånemark, nas décadas de 50 e 60 do século passado, sobre a microcirculação óssea, o titânio (Ti) foi caracterizado como material capaz de sofrer osseointegração. Este termo refere-se ao contato direto entre o tecido ósseo vivo e a superfície do metal (Albrektsson et al., 1981). Além disso, as excelentes propriedades mecânicas, resistência à corrosão e biocompatibilidade tornaram o titânio e suas ligas os materiais de escolha na confecção de implantes cirúrgicos, sejam ortopédicos ou dentais (Kasemo, 1983; Kasemo; Lausmaa, 1988; Ducheyne; Cuckler, 1987; Dallant et al., 1987; Steinemann, 1998; Long; Rack, 1998; Okazaki et al., 2001; Scharnweber et al., 2002; Oliveira, 2003).

Os implantes osseointegrados apresentam diversos desenhos macroscópicos, sendo os cilíndricos, cônicos e rosqueáveis os mais utilizados (Brånemark, 1983; Brunette et al., 1988; Ellingsen, 2000). Mais ainda, podem apresentar diferenças topográficas de superfície, que pode ser lisa e sem revestimento, ou rugosa, porosa (interligada ou não), revestida e texturizada. As alterações topográficas produzidas na superfície dos implantes durante a fabricação têm a finalidade de facilitar o processo de osseointegração e estão relacionadas diretamente às taxas de sucesso (Albrektsson et al., 1981; Kasemo, 1983; Roberts et al., 1984; Bowers et al., 1992; Boyan et al., 1996; Ellingsen, 1998; Pilliar, 1998a; Pilliar et al., 1998b; Brunski et al., 2000; Fini et al., 2003; Zinger et al., 2005).

Em alguns sistemas de implantes, o substrato denso metálico é modificado para que ocorra a formação de uma superfície rugosa (Deporter et al., 1986; Bobyn et al., 1987; Deporter et al., 1990;

Cook; Rust-Darwicki, 1995; Deporter et al., 1999; Deporter et al., 2001; Thieme et al., 2001; Frosch, 2002; Frosch et al., 2003; Zhu et al., 2004; Zinger et al., 2005; Vasconcellos et al., 2008) por meio da utilização de pós esféricos, fibras ou jateamento de plasma-spray. Estas modificações de superfície visam aperfeiçoar a resistência interfacial entre o material e o osso, por meio da interdigitação do tecido ósseo com o implante, proporcionando melhor fixação do mesmo. Além disso, a modificação topográfica da superfície de implantes assume importância fundamental em áreas de pouca quantidade óssea, nas quais a utilização de implantes curtos é muito frequente. Desta forma, apesar da menor área externa de osseointegração nestes implantes, estas modificações de superfície aumentariam a área de neoformação óssea para o interior destes (Deporter et al., 1999; Deporter et al., 2001; Vasconcellos et al., 2008).

Entretanto, os mecanismos exatos de como a topografia de superfície dos implantes podem influenciar a osseointegração ainda não foram completamente elucidados. A microarquitetura ideal para que os eventos celulares ocorram com maior eficácia vem sendo tema de inúmeras pesquisas (Bowers et al., 1992; Ellingsen, 1998; Kienapfel et al., 1999; Thieme et al., 2001; Lee et al., 2002; Diniz et al., 2002; Frosch et al., 2003; Anselme; Bigerelle, 2005; Zinger et al., 2005; Masaki et al., 2005; Moura et al., 2007; Le Guéhennec et al., 2007; Nebe et al., 2007; Le Guéhennec et al., 2008; Oliva et al., 2009; Lamolle et al., 2009), inclusive relacionando o sucesso ou insucesso de implantes dentais com as propriedades químicas (Albrektsson et al., 1981; Boyan et al., 1996; Ellingsen, 1998; Pilliar, 1998a; Pilliar et al., 1998b; Scharnweber et al., 2002; Morra et al., 2003; Cassinelli et al., 2003; Le Guéhennec et al., 2007) e biológicas (Ellingsen, 1998; de Bruijn et al., 1999; Frosch et al., 2002) das suas superfícies e com a micromorfologia dessas. Assim, características da superfície do biomaterial como rugosidade, porosidade, energia de superfície (Kasemo, 1983; Bowers et al., 1992; Ellingsen, 1998; Pilliar, 1998; Briggs et al., 2004; Anselme; Bigerelle, 2005; Zinger et

al., 2005; Masaki et al., 2005; Moura et al., 2007; Le Guéhennec et al., 2007; Nebe et al., 2007; Le Guéhennec et al., 2008; Oliva et al., 2009; Lamolle et al., 2009), técnica de esterilização (Vidigal Jr. et al., 1999), presença de cristais de hidroxiapatita (Pilliar et al., 1991; Xianmiao et al., 2009; Fang et al., 2009), são determinantes na interação inicial das células. Sabe-se que as células não se ancoram diretamente nos materiais, mas interagem com este por meio de uma interposta camada de biomoléculas, composta por proteínas e lipídeos. A topografia da superfície do biomaterial e suas características químicas determinarão a adsorção das biomoléculas e a sua orientação na superfície têm consequências diretas no recrutamento, adesão, proliferação e diferenciação celular. Dessa forma, o próprio biomaterial pode induzir a uma multiplicidade de respostas celulares que conduzem ao resultado desejado alterando-se apenas a superfície do implante, conforme comprovado por trabalhos que envolviam estudos biomoleculares em culturas de células osteoblásticas sobre diferentes superfícies de titânio (Boyan et al., 1996; Schneider et al., 2003; Guizzardi et al., 2004; Anselme; Bigerelle, 2005; Galli et al., 2005; Masaki et al., 2005; Lamolle et al., 2009). Assim, a biocompatibilidade de um material pode ser avaliada através do comportamento das células, quando em contato com este, especialmente pela adesão celular à sua superfície. Características do material, como topografia, propriedades químicas e energia de superfície atuam diretamente na adesão de osteoblastos ou indiretamente, como resultado da interação com proteínas da matriz extracelular, proteínas de membrana e do citoesqueleto, que irão intermediar a adesão celular. A adesão e espalhamento celular pertencem à primeira fase da interação organismo-implante e a forma como esses fenômenos ocorrem influenciarão as fases seguintes de proliferação e diferenciação.

Além de beneficiar fenômenos celulares, o desenvolvimento de implantes com superfície porosa busca permitir o crescimento de tecido ósseo interligado no interior dos poros. Esta

interdigitação se reflete como maior área de contato entre o implante e o osso e, portanto, uma fixação mais eficiente (Deporter et al., 1990; Shenck; Buser, 1998; Deporter et al., 1999; Deporter et al., 2001; Vasconcellos et al., 2008). Entretanto, há uma rugosidade ideal para que os eventos celulares ocorram com maior eficácia e mais pesquisas são necessárias para se conhecer como as propriedades da superfície influenciam a resposta tecidual.

Desta forma, o objetivo desse estudo será avaliar e comparar a resposta de células osteogênicas cultivadas em amostras de titânio densas e com diferentes porosidades, confeccionadas pela técnica de metalurgia do pó.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para o melhor entendimento e organização da revisão da literatura, esta foi dividida em tópicos como se segue.

2.1 Biomateriais e biocompatibilidade

O estudo dos biomateriais têm sido um dos principais temas das pesquisas no campo da Implantodontia. Diferentes áreas do conhecimento, como a biologia, química e física atuam no desenvolvimento de novos biomateriais na busca por melhores resultados na osseointegração dos implantes dentais. Dentre estas pesquisas estão aquelas que investigam a interação das células com diferentes superfícies de implantes. Estudos *in vitro* têm mostrado que superfícies de implantes modificadas influenciam positivamente as respostas celulares (Bowers et al., 1992; Brunette et al., 1988; Boyan et al., 1996; Lumbikanonda; Sammons, 2001; Mustafa et al., 2001; Aparicio et al., 2002; Lee et al., 2002; Diniz et al., 2002; Frosch et al., 2002; Frosch et al., 2003; Rosa; Belotti, 2003; Zhu et al., 2004; Zinger et al., 2005; Masaki et al., 2005; Moura et al., 2007; Le Guéhenne et al., 2007; Nebe et al., 2007; Le Guéhenne et al., 2008; Oliva et al., 2009; Lamolle et al., 2009).

A capacidade de populações celulares formarem tecidos e órgãos é resultado do contato intercelular mediado por diversas proteínas de superfície. Além de promoverem agregação celular, estas moléculas protéicas elaboram junções especializadas que estabilizam as ligações intercelulares, facilitando a comunicação entre células adjacentes. As

células animais ainda são capazes de secretar glicoproteínas (matriz extracelular) que possuem a função de suporte e também atuam como importante reservatório de informações que irão exercer influência direta no comportamento celular (Lodish et al., 1995).

As interações celulares participam diretamente nos processos de diferenciação, morfogênese, proliferação e migração, e, portanto, estão envolvidas em diversos fenômenos naturais como a embriogênese, cicatrização, inflamação e integração do tecido ao biomaterial (Hynes, 1992).

A biocompatibilidade de um material pode ser avaliada através do comportamento das células quando em contato com este, especialmente pela adesão celular à sua superfície. A primeira fase da interação célula/material corresponde à adesão e ao espalhamento, sendo que a qualidade dessa etapa influenciará a proliferação e diferenciação celular. Durante a interação osteoblasto-implante, algumas proteínas envolvidas na adesão destas células à superfície do material, como proteínas da matriz extracelular, integrinas e caderinas, podem ter sua expressão alterada de acordo com as características da superfície do implante (Anselme, 2000). Portanto, a osseointegração dos implantes dentais é resultante direta da adesão e espalhamento de células osteogênicas na superfície dos implantes (Bowers et al., 1992; Boyan et al., 1996).

Além da alta resistência mecânica e à corrosão, o Ti apresenta uma peculiaridade importante que o torna um material biocompatível. A formação espontânea de uma película de óxido de titânio quando o metal reage com o ar, além de ser uma barreira importante contra corrosão (Dallant et al., 1987; Steinemann, 1998; Scharnweber et al., 2002), favorece a ligação da matriz extracelular (MEC) à superfície do implante. Kanagaraja et al. (2001) relataram que a espessura da camada de óxido associada à rugosidade da superfície,

influencia positivamente a adesão e proliferação celular sobre a superfície.

Os implantes dentais de Ti, além de apresentarem a formação da camada óxida, ficam expostos a diferentes íons, polissacarídeos, carboidratos e proteínas, bem como a células, tais como condrócitos, fibroblastos e osteoblastos, que interagem com sua superfície (Ellingsen, 1998). Inicialmente, ocorrerá a adsorção de proteínas sintetizadas pelas células e provenientes do sangue, seguida pela adesão celular à superfície do implante (Boyan et al., 1996; Kasemo; Lausmaa, 1988). Em estudos com cultura celular, imediatamente após a introdução do material, ocorre a adsorção orientada de solutos, que pode influenciar na adsorção de moléculas subseqüentes. O material será recoberto por uma mistura de lipídeos, açúcares, íons e proteínas específicas para a composição química e topografia do substrato (Boyan et al., 1996).

A morfologia da superfície do implante possui fundamental importância nos eventos biológicos que ocorrem na interface osso/material. A variação entre superfície lisa e rugosa na região de interface influencia as biomoléculas e células, resultando em tipos diferentes de adesão (Kasemo; Lausmaa, 1988; Lee et al., 2002; Briggs et al., 2004; Zinger et al., 2005) e também na expressão de alguns genes de osteoblastos (Schneider et al., 2003; Masaki et al., 2005; Zinger et al., 2005; Nebe et al., 2007). Do mesmo modo, o manuseio durante a fabricação, os métodos de esterilização e a técnica cirúrgica também são capazes de interferir nas interações moleculares e, portanto na adesão, proliferação e diferenciação celulares, favorecendo ou prejudicando a osseointegração (Albrektsson et al., 1981; Kasemo, 1983; Lee et al., 2002).

2.2 Técnicas de obtenção de porosidade em metais utilizados como implantes

Modificações na morfologia dos implantes osseointegrados são empregadas desde o início da sua utilização, sendo que a incorporação de roscas à sua geometria foi realizada inicialmente por Brånemark. Tais modificações sempre foram motivadas com o intuito de melhorar a osseointegração e diversos estudos *in vivo* (Dallant et al., 1987; Deporter et al., 1990; Cook; Rust-Darwicki, 1995; Deporter et al., 1996; Deporter et al., 1999; Shenck; Buser, 1998; Deporter et al., 2001; Deporter et al., 2002; Vasconcellos et al., 2008) e *in vitro* (Bowers et al., 1992; Brunette et al., 1988; Boyan et al., 1996; Lumbikanonda; Sammons, 2001; Mustafa et al., 2001; Aparicio et al., 2002; Lee et al., 2002; Diniz et al., 2002; Frosch et al., 2002; Frosch et al., 2003; Rosa; Belotti, 2003; Zhu et al., 2004; Zinger et al., 2005; Masaki et al., 2005; Moura et al., 2007; Le Guéhennec et al., 2007; Nebe et al., 2007; Le Guéhennec et al., 2008; Oliva et al., 2009; Lamolle et al., 2009) revelaram melhores resultados com a utilização de amostras de superfície rugosa ou porosa em comparação com amostras de superfície lisa.

O diferencial dos implantes com superfície porosa consiste no crescimento de tecido ósseo para o interior dos poros, interconectados ou não, também denominado *bone ingrowth* (Pilliar, 1983; Deporter et al., 1986; Cook; Rust-Darwicki, 1995; Deporter et al., 1999; Deporter et al., 2001; Deporter et al., 2002; Zinger et al., 2005; Vasconcellos et al., 2008).

Dentre os diversos processos existentes para a confecção do revestimento poroso, a técnica da metalurgia do pó se mostra eficaz. Esta técnica permite que os poros apresentem um formato de rede, o controle da composição química e aperfeiçoa as propriedades mecânicas através do controle das características dos pós e do processo de consolidação, isto é, o diâmetro, a configuração e a porosidade podem

ser perfeitamente controlados (Pilliar, 1983; Bram et al., 2000; Li et al., 2001; Oliveira et al., 2002; Oliveira, 2003). Uma importante diferença com as técnicas convencionais é a produção de componentes com características estruturais e físicas difíceis de obter por qualquer outro processo metalúrgico e a confecção de formas definitivas dentro de padrões muito restritos, como formato de rede (Bellinati, 1999). A presença de macroporos interligados permite a deposição de tecido ósseo no interior da rede, enquanto que a forma complexa das paredes promove uma estrutura que suporta a organização do tecido em crescimento, melhorando a fixação biológica e evitando quebras que podem resultar na mobilidade do implante (Boyan et al., 1996; Brunski et al., 2000; Sepulveda et al., 2002; Vasconcellos et al., 2008).

Outra vantagem da técnica da metalurgia do pó em comparação com a metalurgia convencional é a economia de matéria-prima e redução do número de etapas complementares (Bellinati, 1999; Deporter et al., 1999).

Bram et al. (2000) analisaram amostras de titânio, ligas de níquel (Ni) e aço inoxidável com alta porosidade a partir da utilização do aditivo orgânico carbamida. As partículas do aditivo tinham diâmetro de 0,8 mm a 6 mm e sua quantidade variava de acordo com a porosidade (60 %, 70 % ou 80 %) exigida após a sinterização. Após a associação do pó do metal ao aditivo, essa mistura era compactada em um recipiente cilíndrico sob uma prensa uniaxial, para que posteriormente se realizasse prensagem isostática com 166 MPa. A remoção do aditivo orgânico era realizada a 200° C e o processamento era finalizado com sinterização a 1200° C em forno a vácuo. Foram realizadas análises de microscopia óptica e varredura, nas quais os autores observaram uma taxa de porosidade entre 60 % e 80 %, com poros de diâmetro entre 0,1 mm e 2,5 mm e distribuição homogênea. Os autores concluíram que esta técnica propiciou a formação de porosidade adequada através da associação da uréia.

Yang et al. (2000) avaliaram implantes com superfície porosa, porém nos quais a porosidade foi obtida pela técnica de *plasma spraying* na atmosfera de argônio. Foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), energia de difração de raios X (EDS), medidas de rugosidade e teste mecânico. Os resultados mostraram que os poros eram maiores na camada mais externa (100 μm a 150 μm de diâmetro) e à medida que se observava as camadas mais profundas estes eram menores. Segundo os autores este método de obtenção do revestimento poroso proporcionou eficiente adesão física e mecânica entre o recobrimento de titânio e o substrato.

Outras ligas como a de níquel-titânio (NiTi) também têm se mostrado um promissor biomaterial devido às suas boas propriedades mecânicas e módulo de elasticidade. Li et al. (2001) fabricaram amostras de NiTi por meio da técnica de metalurgia do pó e as análises metalográfica e MEV mostraram uma rede interligada de poros com diâmetro médio entre 300 μm e 600 μm e volume de porosidade de 60 a 64%.

Oliveira et al. (2001) observaram os efeitos da variação da granulação dos pós e da pressão isostática. Foram confeccionados quatro diferentes tipos de corpos de prova e as análises metalográfica e MEV revelaram que a taxa de porosidade, o tamanho dos poros e a espessura do recobrimento variaram com alterações da pressão isostática. Os melhores resultados foram obtidos com pressão isostática de 200 MPa, na qual as amostras apresentavam 24% de porosidade, tamanho médio dos poros de 119 μm e espessura de recobrimento de 953 μm .

Wen et al. (2002) confeccionaram amostras de titânio comercialmente puro com grânulos de 45 μm , associado a partículas de bicarbonato de amônio como aditivo, apresentando granulometria de 200 μm a 600 μm . As amostras foram manufaturadas pela técnica da metalurgia do pó, em que se utilizou pressão isostática de 200 MPa e tratamento térmico em duas fases: 200° C por 5 horas e 1200° C por 2

horas. Foram observados dois tipos de poros nas amostras. Os macroporos foram denominados tipo 1 e apresentavam-se interligados, com diâmetro variando entre 200 μm e 500 μm . Os microporos, denominados tipo 2, possuíam diâmetro em torno de 12 μm . O total de poros correspondia a 80% da amostra. Segundo os autores, os poros do tipo 1 exercem papel fundamental no crescimento de novo tecido ósseo em seu interior e no transporte de fluídos, enquanto que os do tipo 2 são considerados potencialmente osteoindutores. No teste mecânico de compressão obteve-se valor de estresse de 40 MPa. Desta forma, os autores concluíram que a técnica da metalurgia do pó foi eficaz na confecção das amostras e preencheu todos os requisitos para utilização clínica.

Oliveira et al. (2002) pesquisaram os níveis de porosidade adequados aos revestimentos de implantes cirúrgicos, destacando os parâmetros de processamento, especialmente a pressão de compactação e o tamanho da partícula do pó de titânio sobre a porosidade do revestimento. Avaliaram ainda a eficácia do uso de um aditivo orgânico (pó de naftaleno) no aumento do tamanho dos poros e na porosidade final do revestimento. As amostras foram confeccionadas com substrato de liga de Ti-6Al-7Nb e recobrimentos de diferentes materiais como o pó de titânio puro e fino (30 μm a 70 μm) produzido pelo CTA/IAE e pó de titânio puro (80 μm a 100 μm) fabricado pela empresa Micron Metals (EUA), associados ao pó de naftaleno. O recobrimento foi conformado através de compactação isostática a frio com 300 MPa e finalizado com sinterização a 1200° C. Foram realizadas análises metalográfica e MEV. Os autores concluíram que o controle do tamanho da partícula dos pós de titânio e a associação de aditivo orgânico são importantes no controle da porosidade.

Recentemente, Vasconcellos et al. (2008) avaliaram a influência do desenho de implantes sobre a osteogênese e fixação destes. Os autores utilizaram dois tipos de implantes: rugosos e porosos

(37% de porosidade e poros com diâmetro médio de 480 μm), confeccionados pela técnica de metalurgia do pó. Os implantes foram inseridos nas tíbias de coelhos e deixados em posição, livres de carga, por 4 e 8 semanas. Os resultados sobre a porcentagem de contato osso-implante demonstraram-se maiores, em todos os períodos, nos implantes porosos. Os testes mecânicos também se mostraram maiores, em ambos os períodos, nos implantes porosos. Os autores atribuem os resultados à maior área de contato osso-implante presente nos implantes porosos, sendo estes implantes de grande importância em casos desfavoráveis com relação à quantidade óssea disponível.

2.3 Estudos sobre modificações na superfície de implantes osseointegrados

Como demonstrados a seguir, muitos estudos *in vivo* e *in vitro*, que confrontaram diferentes tipos de tratamentos de superfície, demonstraram vantagens para a osseointegração dos implantes de titânio com superfície rugosa e/ou porosa.

Bowers et al. (1992) avaliaram células semelhantes a osteoblastos cultivadas em superfícies de titânio com diferentes morfologias. Foram confeccionados corpos de prova medindo 12,5 mm de diâmetro por 4 mm de comprimento, divididos em dois grupos: superfície rugosa de morfologia regular e irregular. O tratamento da superfície foi realizado com jateamento de óxido de alumínio, tratadas com ácido por 1, 5 e 10 minutos. As células cultivadas foram obtidas da calvária de ratos com três dias de vida. A microscopia eletrônica de varredura mostrou maior adesão celular nas superfícies rugosas irregulares, o que, segundo os autores, deve-se ao efeito benéfico da rugosidade na resposta inicial das células. Os autores concluem que implantes com rugosidades na

superfície favorecem a adesão de osteoblastos e propiciam uma maior área de contato com o tecido ósseo.

Boyan et al. (1996) em uma ampla revisão da literatura acerca do comportamento celular no processo de remodelação óssea, observaram que a topografia e propriedades químicas das superfícies de implantes, influenciam diretamente quais e como algumas biomoléculas serão adsorvidas na superfície e, conseqüentemente, como ocorrerá à adesão celular, uma vez que, osteoblastos e condrócitos são sensíveis a sutis diferenças de rugosidade e composição química da superfície. Desta forma, os autores concluem que modificações de superfície de implantes, que buscam aumento de rugosidade, podem melhorar a qualidade da osseointegração.

Em uma revisão da literatura sobre topografias de superfície de implantes, Ellingsen (1998) observou que existe uma grande discussão sobre o tipo de rugosidade que proporcionaria melhores resultados de osseointegração. O autor observou que a rugosidade de superfície pode ser avaliada em diferentes níveis: macroscópico, microestrutural e ultraestrutural. A rugosidade teria um efeito diferente no tecido ósseo de acordo com o diâmetro mínimo dos poros, que deveria ter pelo menos 100 μm . Da mesma forma, as propriedades químicas do material influenciariam na resposta tecidual. O tipo de superfície e suas características determinariam a intensidade da adesão ao osso.

Kienapfel et al. (1999) estudaram amplamente implantes que apresentavam fixação por *bone ingrowth* (crescimento ósseo para o interior de poros e sulcos). Os autores observaram uma tendência às modificações da superfície de implantes por técnicas de recobrimento. O efeito do diâmetro dos poros também foi investigado e a faixa ideal do seu tamanho variou entre 100 μm e 400 μm . A quantidade de crescimento ósseo para dentro dos poros depende da estabilidade primária clínica do implante, mas pode variar de acordo com seu formato, técnica cirúrgica e fatores inerentes ao paciente.

de Brujin et al. (1999), estudaram amostras de fosfato de cálcio poroso e placas de titânio previamente cultivadas em células osteoblásticas de ratos, cabras e humanos. Essas amostras foram implantadas subcutaneamente em ratos para se verificar o potencial de formação de novo tecido ósseo. Os animais foram sacrificados nos períodos de uma, duas, quatro e seis semanas e foram realizadas análises por microscopia óptica e varredura. Os resultados mostraram que as células ósseas podem se proliferar *in vitro* e manter seu potencial osteogênico *in vivo* e *in vitro*.

Lumbikanonda e Sammons (2001) compararam as interações de células ósseas com implantes de titânio de superfície lisa, jateadas com dióxido de titânio, superfície modificadas por plasma spray de titânio (TPS) e implantes recobertos com hidroxiapatita (HA). Os implantes foram colocados em cultura de células ósseas de ratos recém-nascidos por vinte minutos e, posteriormente, foi avaliada a aderência destas células às diferentes superfícies, por meio de MEV. Foi verificado que a superfície TPS promoveu um espalhamento mais rápido das células do que os implantes com superfície recoberta com HA ou de titânio puro, enquanto que na superfície de titânio jateada com dióxido, não ocorreu adaptação das células à superfície. Os autores afirmaram que a superfície do implante interfere no resultado final da reparação óssea, uma vez que a superfície TPS favoreceu o espalhamento e a adesão celular.

Mustafa et al. (2001) também avaliaram a adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos humanos, provenientes do osso mandibular, sobre diferentes superfícies de implantes. As superfícies dos implantes foram jateadas com diferentes tamanhos (63-90 μm , 106-180 μm e 180-300 μm) de partículas de óxido de titânio (TiO_2). Foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura, aferições indiretas da síntese de DNA, avaliação da atividade da fosfatase alcalina (ALP) e síntese de osteocalcina. Os resultados obtidos demonstraram uma relação direta entre a irregularidade da superfície (jateamento com

partículas de 180-300 μm) e a proliferação e diferenciação celular. No entanto, o mesmo não foi observado para a adesão celular, na qual os resultados obtidos com as amostras jateadas com partículas de 63-90 μm foram semelhantes aos dos outros grupos. Concluiu-se que a proliferação e diferenciação celular foram aumentadas pelas rugosidades na superfície dos implantes e que o jateamento com partículas de 300 μm de diâmetro não resultou em melhor adesão celular quando comparado ao jateamento com partículas menores.

Em 2002, Knabe et al. investigaram diferentes superfícies de titânio e HA utilizando cultura de osteoblastos de ratos. As amostras foram diferenciadas em quatro grupos: titânio poroso (Ti-TPS), titânio tratado com ataque ácido + jateamento (Ti-DPS), superfície lisa e titânio associado com HA porosa. A cultura foi avaliada diariamente até completar 14 dias de incubação. Os autores observaram que as superfícies TPS e DPS apresentaram melhor distribuição e proliferação celular, enquanto que a HA exibiu um atraso no padrão de crescimento.

Aparicio et al. (2002) avaliaram *in vitro* a resposta de osteoblastos humanos em amostras de titânio comercialmente puro (t.c.p.), após um, três, sete e 14 dias de cultura. Foram estudados sete diferentes grupos de discos: polietileno (controle negativo); ti – titânio usinado; Si – jateamento com carbetto de silício (SiC); Al – jateamento com óxido de alumínio (Al_2O_3); Ti-2S – usinado + tratamento termo-químico; f) Si-2S – jateado com SiC + tratamento termo-químico; Al-2S – jateamento com Al_2O_3 + tratamento termo-químico. Os discos foram analisados em MEV, difração de raios X, energia de dispersão de raios X (EDS) e rugosidade de superfície. Os resultados dos valores médio da rugosidade de superfície mostraram que os grupos jateados apresentaram rugosidade significativamente maior do que os grupos não jateados. As análises por meio de EDS e MEV evidenciaram a presença de SiC e Al_2O_3 nos discos, e a existência de um gel de titanato de sódio na superfície, aspecto que proporciona o comportamento bioativo da

amostra. Os autores concluíram que a rugosidade e a capacidade bioativa da amostra promovem um aumento na adesão e diferenciação das células osteoblásticas, diminuindo o tempo de osseointegração.

Diniz et al. (2002) descreveram o efeito dos tratamentos ácidos na composição, rugosidade e morfologia da superfície de amostras de Ti submetidas ao jateamento. As amostras foram divididas em três partes que foram processadas da seguinte maneira: jateamento com areia – amostras G_0 ; jateamento com partículas de óxido de alumínio com 65 μm – amostras $B65_0$; jateamento com partículas de óxido de alumínio com 250 μm – amostras $B250_0$. Em seguida, foram seccionadas em três fragmentos. Portanto, cada um dos três tipos de amostra foi dividido em três novos grupos que receberam tratamentos diferentes: (i) as amostras foram mantidas como anteriormente, (ii) submetidas a ataque químico com ácido sulfúrico – G_S ; $B65_S$; $B250_S$, e (iii) submetidas a ataque químico com ácido hidrófluorídrico – G_F ; $B65_F$; $B250_F$. Após os tratamentos mecânicos e químicos as amostras foram caracterizadas quanto à rugosidade e avaliadas utilizando cultura de células osteoblásticas de medula óssea humana. As células ósseas proliferaram bem em todas as superfícies de titânio. Contudo, quando foi avaliada a capacidade de formação de matriz mineralizada, as amostras jateadas e tratadas com ácido hidrófluorídrico apresentaram melhor resultado, sendo que as amostras jateadas com partículas de 250 μm foram ainda melhores. Portanto, concluiu-se que estas células osteoblásticas parecem ser muito sensíveis às variações de topografia de superfície, sugerindo que a rugosidade e a morfologia das superfícies podem modular a resposta celular.

Rosa e Beloti (2003) estudaram o efeito de diferentes rugosidades de amostras de titânio comercialmente puro, sobre a adesão, proliferação e diferenciação de células humanas de medula. Os autores confeccionaram discos de titânio com superfície lisa e jateados com diferentes tamanhos de partículas de Al_2O_3 (25 μm , 75 μm e 250 μm). A

rugosidade média (R_a) mensurada variou entre 0,24 μm (superfície lisa) e 1,91 μm (jateamento com partículas de 250 μm). Sobre as amostras foram cultivadas células provenientes da medula humana e avaliadas a adesão, proliferação e diferenciação celular, através do conteúdo de proteína total, atividade da fosfatase alcalina e formação de matriz nodular mineralizada. Os resultados demonstraram que houve adesão celular em todas as amostras e que não houve diferença significativa entre as superfícies. Por outro lado, nas amostras com R_a entre 0,80 μm e 1,90 μm a proliferação reduziu, enquanto que, o conteúdo de proteína total e a atividade da fosfatase alcalina aumentaram. Os autores concluíram que valores de R_a entre 0,80 μm e 1,90 μm podem melhorar a resposta celular nas fases intermediárias e finais, mas não afetam as respostas iniciais.

Zhu et al. (2004) avaliaram a influência da rugosidade de superfície de amostras de titânio em células provenientes de osteossarcoma (SaOS-2). As amostras de Ti foram submetidas à oxidação anódica para a obtenção de poros na superfície. Amostras com superfície lisa foram utilizadas como controle. O diâmetro dos poros variava de 0,5 μm a 2 μm e a rugosidade média de 0,2 μm a 0,4 μm . Observou-se que a adesão celular foi maior nas superfícies rugosas e a morfologia das células aderidas também variou de acordo com a superfície. Na superfície lisa as células apresentavam menor quantidade de prolongamentos (filopódios) e estes eram mais curtos. Por outro lado, nas superfícies rugosas, os filopódios eram bem definidos e penetravam nos poros.

Zinger et al. (2005) cultivaram células de linhagem osteoblástica (MG63) sobre diferentes amostras de titânio. As superfícies eram lisas, com jateamento e ataque ácido (SLA) ou tratamento eletroquímico para obtenção de porosidades com 10 μm , 30 μm e 100 μm . Foi avaliado o número de células presentes após 5 dias de cultivo, diferenciação celular (fosfatase alcalina e osteocalcina) e níveis locais de fatores de crescimento (TGF- β 1 e PGE₂). As amostras com cavidades de

100 μm favoreceram a adesão e crescimento celular, enquanto que, as amostras com rugosidades na superfície beneficiaram a diferenciação e produção de TGF- β 1. Os autores concluíram que a microtopografia das superfícies alterou a produção de fatores de crescimento locais e estes, por sua vez, favoreceram a proliferação e diferenciação osteoblástica.

Recentemente, Le Guéhennec et al. (2007) compararam quatro superfícies de titânio: lisa (polida), jateada com alumina, jateada com fosfato de cálcio (BCP-Ti) e uma superfície disponível comercialmente (SLA). Foram cultivadas células osteoblásticas MC3T3-E1 e realizados testes para caracterização das superfícies, quanto à rugosidade média e ângulo de contato, para observação da hidrofiliidade. As amostras BCP-Ti foram as que apresentaram maior média de rugosidade ($R_a = 2,50 \mu\text{m}$). As amostras mais hidrofílicas foram as com jateamento de alumina e as mais hidrofóbicas foram as SLA. Os testes *in vitro* avaliaram a morfologia das células aderidas, após 2 dias de cultivo, a viabilidade celular (teste MTT) e o conteúdo de proteína total e atividade da fosfatase alcalina. As amostras SLA e BCP-Ti obtiveram os maiores valores de viabilidade celular. O molhamento das superfícies SLA e BCP-Ti não interferiu na viabilidade celular e atividade da fosfatase alcalina, ou seja, os valores obtidos foram semelhantes na superfície mais hidrofóbica (SLA) e na superfície hidrofílica BCP-Ti. Os autores justificam esse resultado com a diferente constituição química das duas superfícies. A diferenciação celular, expressada através da atividade da fosfatase alcalina, foi maior nas amostras SLA e BCP-Ti, especialmente nos períodos iniciais de avaliação. Concluiu-se que a rugosidade das superfícies correlaciona-se diretamente com a adesão, proliferação e diferenciação de células osteoblásticas.

Lamolle et al. (2009) estudaram as características físicas, químicas e a biocompatibilidade de amostras de titânio submetidas a diferentes períodos de imersão em soluções de ácido fluorídrico (HF). Os períodos foram 40, 90, 120 e 150 segundos (grupos 1, 2, 3 e 4). Amostras

de superfície lisa foram utilizadas como controle. Sobre as superfícies foram cultivados osteoblastos murinos (MC3T3-E1) e avaliadas a adesão e viabilidade celular. A diferenciação das células foi avaliada pela análise da reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR). Os resultados obtidos demonstraram um aumento na rugosidade média das superfícies modificadas pelo ataque ácido. Tais superfícies também obtiveram os maiores valores de adesão celular e a morfologia das células aderidas variou de acordo com as superfícies analisadas. Nas amostras controle (lisas) as células apresentavam uma conformação poligonal, enquanto que, nas amostras rugosas a morfologia era triangular (grupo 2) ou unidirecional (grupo 4), após 24 horas. Além disso, nas amostras tratadas as células organizavam-se em camadas tridimensionais, o que não era observado nas superfícies lisas. Por outro lado, não foram encontradas diferenças significantes na expressão dos genes de ALP, osterix (Osx) e osteocalcina (OC), após 7 dias. A justificativa dada pelos autores é que a rugosidade de superfície estimula a diferenciação celular ao invés da proliferação e que possivelmente, em análises de períodos mais longos, a expressão desses genes relacionados à diferenciação celular, pudesse ser aumentada.

3 PROPOSIÇÃO

O propósito deste estudo foi avaliar e comparar a resposta de células osteogênicas cultivadas em amostras de titânio densas e com diferentes proporções de porosidade, confeccionadas pela técnica de metalurgia do pó.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Amostras de titânio

Amostras de titânio foram confeccionadas no Centro Técnico Aeroespacial (CTA) – Divisão de Materiais do Instituto de Aeronáutica e Espaço, por meio da técnica de metalurgia do pó, na forma de discos com 12 mm de diâmetro e 3 mm de altura. Esta técnica envolve três etapas: produção do pó, compactação deste em uma matriz, para conformação, e sinterização para conferir solidez à peça (Bellinati, 1999).

Foram utilizados, para a confecção dos discos, pó de titânio puro grau 2 com granulometria de 8 μm , obtido pela técnica de hidrogenação/desidrogenação (HDH) e uréia, em grânulos triturados e separados na faixa granulométrica de 177 a 250 μm , pela técnica do peneiramento. As peneiras utilizadas possuíam medidas de 80 e 60 mesh, respectivamente. Foram confeccionados 2 tipos de amostras porosas, de acordo com a porcentagem de uréia presente. As amostras densas foram confeccionadas sem a adição de uréia ao pó de titânio.

A função da uréia foi manter o espaço entre os grânulos do pó de titânio até o término do processamento do material, tornando a amostra porosa. A união das partículas do pó de titânio ao espaçador uréia foi realizada em um misturador Y.

A confecção das amostras respeitou a seguinte sequência de eventos:

- a) mistura dos pós: o pó de titânio foi misturado com a uréia a fim de obter-se uma mistura homogênea (Figura 1a);
- b) compactação: inicialmente foi realizada a compactação uniaxial dos componentes, utilizando-se uma matriz cilíndrica medindo 12 mm x 3 mm, submetida a uma prensa hidráulica a uma pressão de 100 MPa. Em seguida, as amostras sofreram compactação isostática a frio, com pressão de 300 MPa (Figura 1b-h);
- c) sinterização: esta etapa foi realizada em forno a vácuo de 10^{-7} toneladas, com ciclo térmico pré-determinado (Thermal Technology, modelo ASTRO) (Figura 1i). Neste equipamento, a temperatura sofre um aumento de 10 °C/min até atingir o patamar de 1200 °C, na qual permanece por 60 min e posteriormente sofre resfriamento. Previamente à sinterização, foi realizada a remoção da uréia, em forno (EDG) a 200 °C / 2 horas;
- d) mensuração: após a confecção, todas as amostras foram medidas, com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo) para a confirmação da sua medida final;

- e) acabamento: após o término da sinterização as amostras sofreram acabamento em máquina politriz;
- f) limpeza das amostras: inicialmente com escova dental macia e detergente neutro, sendo enxaguados em água destilada. Posteriormente, as amostras foram submetidas a banhos sucessivos em ultra-som, por 10 minutos, na seguinte seqüência: água destilada e detergente enzimático, água destilada, etanol 70 %, água destilada. Finalmente, os espécimes foram acondicionados e esterilizados em autoclave (Figura 1j).

As amostras foram divididas em três grupos, como descrito a seguir:

- a) Grupo 1 - controle: amostra de titânio denso (não houve adição de uréia);
- b) Grupo 2 – 30 % de poros com diâmetro médio de 300 μm ;
- c) Grupo 3 – 40 % de poros com diâmetro médio de 300 μm .



Figura 1 - **Procedimentos de confecção das amostras:** a) pó de titânio e uréia em grânulos; b-f) matriz idealizada para a confecção dos implantes; g) prensa uniaxial; h) prensa isostática; i) forno a vácuo – Thermal Technology, modelo ASTRO; j) amostras com diferentes porosidades (grupos 1, 2 e 3).

4.2 Análise metalográfica descritiva

Foram obtidas fotomicrografias em microscopia eletrônica de varredura (MEV) na superfície de 3 amostras de cada grupo, com o objetivo de demonstrar a presença e interligação dos poros. A análise estatística do cálculo da área (μm^2), do comprimento máximo (μm) e da quantidade (%) de poros existente nos três tipos de amostras estudadas foi realizada em estudo prévio (Vasconcellos et al., 2008).

4.3 Procedimentos de cultura celular

4.3.1 Isolamento de células da linhagem osteoblástica e desenvolvimento de cultura primária osteogênica

Células osteogênicas foram isoladas, por digestão enzimática seqüencial, de fragmentos de calvária de ratos Wistar recém-nascidos (2 a 4 dias), através da utilização de solução de tripsina a 0,25% (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e colagenase tipo II a 0,1% (Gibco, Invitrogen), como descrito previamente por Nanci et al (1996). As células foram plaqueadas sobre as amostras de titânio, contidas em placas de poliestireno de 24 poços, na densidade de 20.000 células/poço. As células plaqueadas foram cultivadas por períodos de até 14 dias, em Meio Essencial Mínimo, modificação alfa, com L-glutamina (α -MEM, Gibco, Invitrogen), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen), 7 mM de beta-glicerofosfato (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido ascórbico (Sigma) e 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina (Gibco, Invitrogen), à temperatura de 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5 %

de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase invertida, em poços contendo apenas as células cultivadas, isto é, sem as amostras de titânio (Figura 2).

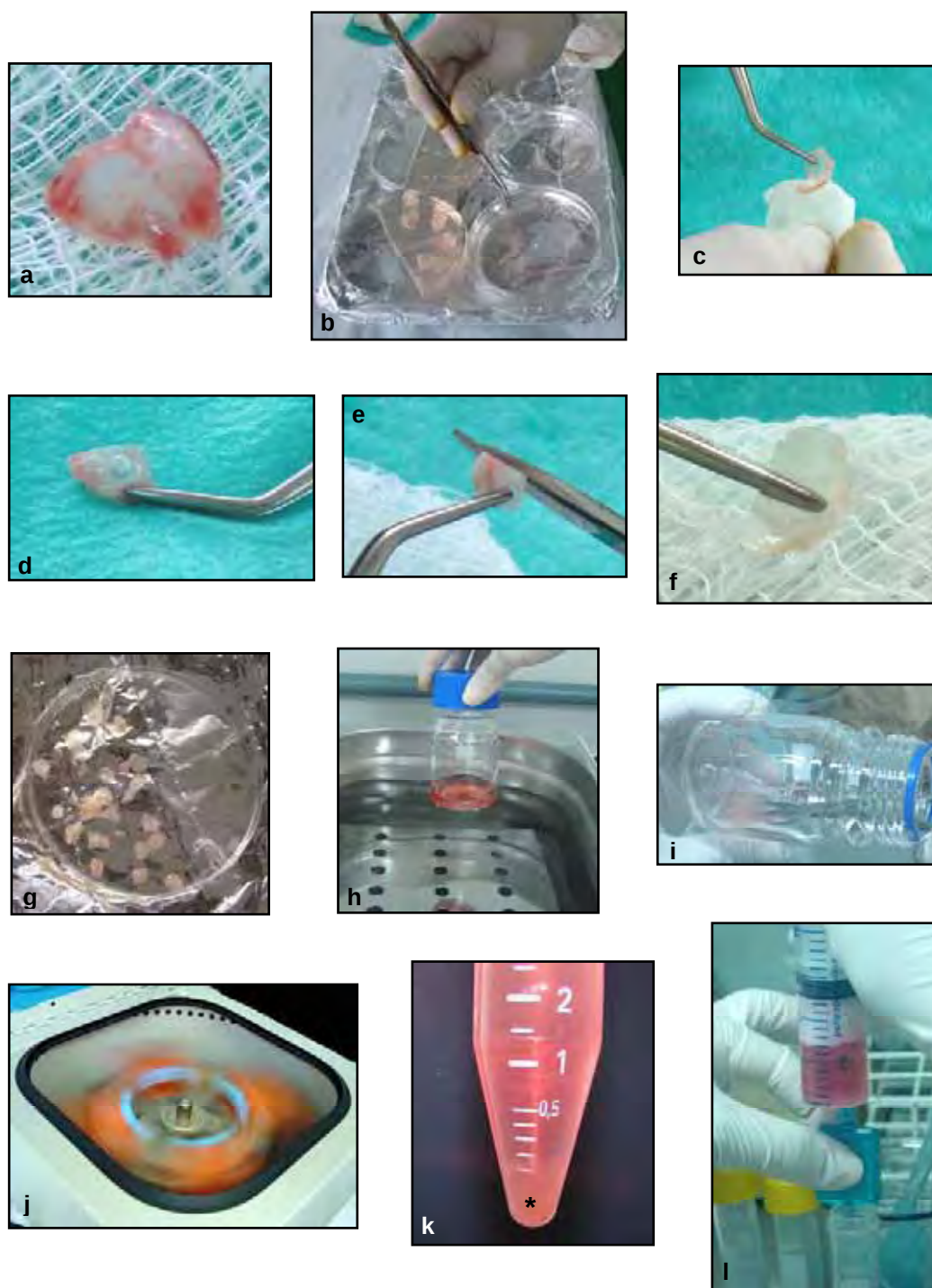


Figura 2 – **Isolamento de células osteogênicas:** a) calvária removida; b) banhos seqüenciais; c-g) remoção de tecido mole e suturas; h) banho-maria sob agitação; i) fragmentação manual; j) centrifugação do sobrenadante; k) *pellet* celular formado (*); l) filtragem das células osteogênicas para cultura.

4.3.2 Adesão celular

Para a avaliação da adesão celular, as células foram cultivadas por 24 horas nas amostras. Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados três vezes, com solução salina fosfato-tamponada (PBS) a 37 °C, para remoção de células não aderidas. As células aderidas foram enzimaticamente removidas das amostras com a utilização de 1 mM de EDTA e 0,25% de tripsina (Gibco). Estas células, depois de coradas com azul de Trypan, foram contadas em uma câmara de Neubauer e os valores obtidos expressados como uma porcentagem do número inicial de células (Figura 3).

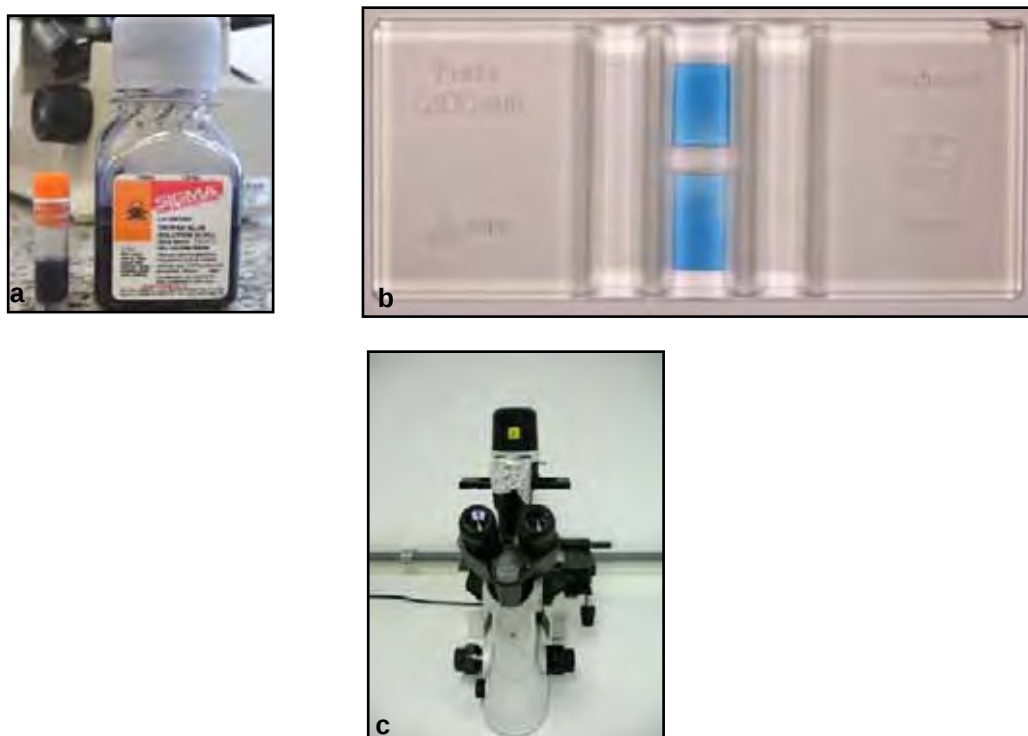


Figura 3 – **Adesão celular:** a) corante azul de Trypan; b) câmara de Neubauer; c) microscópio utilizado para contagem das células na câmara de Neubauer.

4.3.3 Proliferação e viabilidade celular

Para a avaliação da proliferação e viabilidade celular, as células isoladas foram cultivadas nos poços contendo as amostras e avaliadas em três períodos: 7, 10 e 14 dias. A análise foi realizada pelo ensaio colorimétrico MTT [(brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolol] (Sigma), o qual corresponde a um sal que é reduzido por proteínas mitocondrias, ativas apenas em células viáveis. Alíquotas de MTT a 5 mg/ml em PBS foram preparadas, procedendo-se em seguida a incubação das culturas primárias com esta solução a 10%, em meio de cultura, por 4 horas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95 % de ar atmosférico. Após esse período, os poços foram lavados com 1 ml de PBS aquecido e acrescidos de 1 ml de solução de isopropanol ácido (100 ml de isopropanol e 134 µl de HCl), em cada poço, sob agitação por 5 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 200 µl foram obtidas de cada poço e transferidas para placa de 96 poços para mensuração do espectro de cor em espectrofotômetro (570 nm). A leitura foi realizada em duplicata. (Figura 4).



Figura 4 – **MTT**: a) espectrofotômetro (Cambrex ELx808cse); b) placa de 96 poços, contendo as alíquotas para leitura, acondicionada no equipamento.

4.3.4 Conteúdo de proteína total (PTN)

O conteúdo de proteína total foi avaliado após 7, 10 e 14 dias de cultura, de acordo com o método modificado de Lowry. Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados três vezes, com PBS a 37 °C, e preenchidos com 2 ml de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma Chemical, CO., St. Louis, MO, USA). Após 30 minutos, 1 ml da solução de cada poço foi misturado a 1 ml da solução de Lowry (Sigma Chemical, CO., St. Louis, MO, USA) e deixado por 20 minutos em temperatura ambiente. O extrato foi então diluído em reagente de Folin e Ciocalteu (Sigma Chemical, CO., St. Louis, MO, USA) por 30 minutos, em temperatura ambiente, para o desenvolvimento de cor. Após este período, a absorbância foi aferida espectrofotometricamente (Cecil CE3021, Cambridge, Inglaterra) a 680 nm e o conteúdo de proteína total calculado (Figura 5).

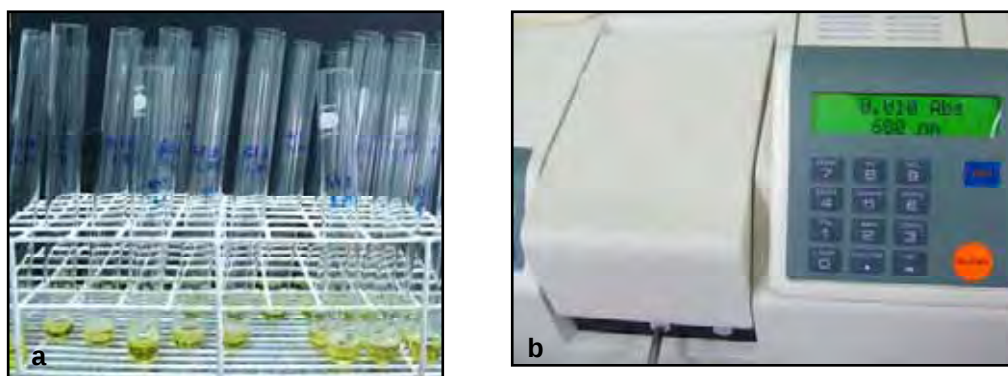


Figura 5 – **PTN total**: a) tubos de ensaio contendo os reagentes; b) espectrofotômetro para leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 680nm.

4.3.5 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A atividade da fosfatase alcalina foi determinada nos mesmos lisados utilizados para a avaliação do conteúdo de proteína total, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando-se um *kit* comercial, de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brasil). Inicialmente, 50 µl de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 ml de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1, por 2 minutos a 37 °C. A solução então foi acrescida com uma alíquota de 50 µl dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 minutos a 37 °C. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 2 ml de Na₂CO₃ a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. Após 30 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro utilizando-se comprimento de onda de 590 nm e a atividade de fosfatase alcalina calculada. Os dados foram expressos como atividade da fosfatase alcalina normalizada pelo conteúdo de proteína total, para culturas primárias nos tempos de 7, 10 e 14 dias (Figura 6).



Figura 6 – **ALP**: a) reagentes para ALP – Kit comercial Labtest; b) tubos de ensaio contendo os reagentes; c) reagentes em banho-maria a 37°C; d) tubos de ensaio contendo os reagentes e alíquotas das amostras; e) alíquota acondicionada em cubeta para leitura; f) espectrofotômetro para leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 590nm.

4.3.6 Quantificação de formações nodulares de matriz mineralizada

Os nódulos de mineralização foram avaliados após 7, 10 e 14 dias de cultura. Após a remoção do meio de cultura, os poços contendo as amostras, foram lavados três vezes com PBS a 37 °C e preenchidos com 2 ml de formaldeído a 10%, para fixação. As placas foram estocadas por 2 horas, em geladeira, antes da remoção do fixador. Após a fixação, as amostras foram desidratadas por meio de séries gradativas crescentes de etanol até 100% e coradas com vermelho de Alizarina S a 2 % (Sigma), pH 4,2, por 10 minutos em temperatura ambiente, para detecção macro e microscópica de acúmulos de cálcio. A quantificação das formações mineralizadas foi realizada de acordo com o método descrito por Gregory et al. (2004). Para tanto, 800 µL de ácido acético 10 % foi adicionado a cada um dos poços contendo as amostras e incubados em temperatura ambiente, sob agitação, durante 30 minutos. Após este período, cada uma das amostras foi raspada com auxílio de uma ponteira, para a remoção de maior quantidade de corante. Todo conteúdo de cada um dos poços foi transferido para microtubos de centrifuga com 1,5 ml e acrescidos com 500 µl de óleo mineral (Sigma-Aldrich, cód. 16140-3), após agitação em vortex por 30 segundos. Os microtubos foram levados ao banho-maria e aquecidos por 10 minutos, a 85 °C sendo posteriormente, transferidos a um becker com gelo por 5 minutos. A seguir foram centrifugados por 15 minutos e 500 µL do sobrenadante, abaixo da camada de óleo mineral, transferidos para um novo microtubo. Neste foram acrescidos 200 µL de hidróxido de amônio a 10 %, para neutralização do ácido. Alíquotas de 150 µL foram transferidas para placas de 96 poços e a leitura realizada em triplicata, em espectrofotômetro, sob o comprimento de onda de 405 nm (Figura 7).



Figura 7 – **Nódulos de mineralização:** a) placa contendo amostras coradas com vermelho Alizarina; b) ácido acético e cloreto de amônio; c) óleo mineral Sigma; d) mesa agitadora; e) agitação manual com pipeta, para remoção de corante; f-h) sequência de processamento dos reagentes; i) placa de 96 poços, contendo as alíquotas para leitura, acondicionada no espectrofotômetro.

4.4 Delineamento experimental e análise estatística

A análise estatística obedeceu a uma estrutura fatorial tipo 3 x 3, sendo as variáveis experimentais, ou fatores de estudo, o tipo de amostra (densa, 30 % e 40 % de porosidade), os períodos de experimentação (7, 10 e 14 dias) e a interação entre elas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio dos programas computacionais: MINITAB (Minitab, versão 14.12, 2004) e STATISTICA (StatSoft, versão 5.5, 2000).

A estatística descritiva consistiu no cálculo de médias e desvio padrão, enquanto que a estatística inferencial foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, ambos ao nível de significância convencional de 5%.

O estudo do efeito interação tipo de amostra x período de experimentação foi conduzido por meio do gráfico de médias realizado no programa computacional Prism (versão 4.00, 2003 Graph Pad Software Inc.).

5 RESULTADOS

Neste capítulo foram analisados os efeitos da porosidade nas amostras de titânio. Foram analisados os dados da metalografia, para caracterização e observação das porosidades e os dados obtidos nos testes *in vitro*, a partir do cultivo de células osteogênicas sobre as amostras de titânio. Foram analisados os dados de adesão, viabilidade e proliferação celular, conteúdo de proteína total, atividade da fosfatase alcalina e quantificação de formações nodulares mineralizadas.

As eventuais contaminações que ocorreram durante a realização dos testes foram solucionadas com a realização de nova cultura primária e novo experimento. Desta forma, em todos os testes realizados foram utilizados três espécimes por grupo experimental (G1, G2 e G3), em cada um dos períodos experimentais.

5.1 Análise metalográfica descritiva

A morfologia e a interligação dos poros foram demonstradas nas imagens obtidas por meio do MEV. Na análise metalográfica, realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), pôde-se observar que os implantes de titânio exibiam superfície porosa com poros apresentando área e formatos variados. As amostras demonstram três tipos de poros: os microporos, os mesoporos e os macroporos. Os microporos eram pequenos e isolados, oriundos da porosidade residual do processo de sinterização, enquanto que os mesoporos e os macroporos eram abertos e interligados, oriundos da

porosidade confeccionada pela adição da fase orgânica (uréia). Esta interligação entre os poros é a responsável pelo crescimento ósseo para o interior dos poros mais centrais.

Na análise metalográfica também foi possível observar a união entre as partículas do pó do titânio, a interligação entre os poros e a rugosidade da parede interna destes poros (Figura 8). Esta união é bastante efetiva, uma vez que não há evidência de separação entre as partículas, aspecto que auxilia bastante no aumento da resistência mecânica da estrutura porosa.

Nas amostras do grupo 1 (densas) foram observados apenas os microporos, pequenos e isolados, oriundos da porosidade residual do processo de sinterização.

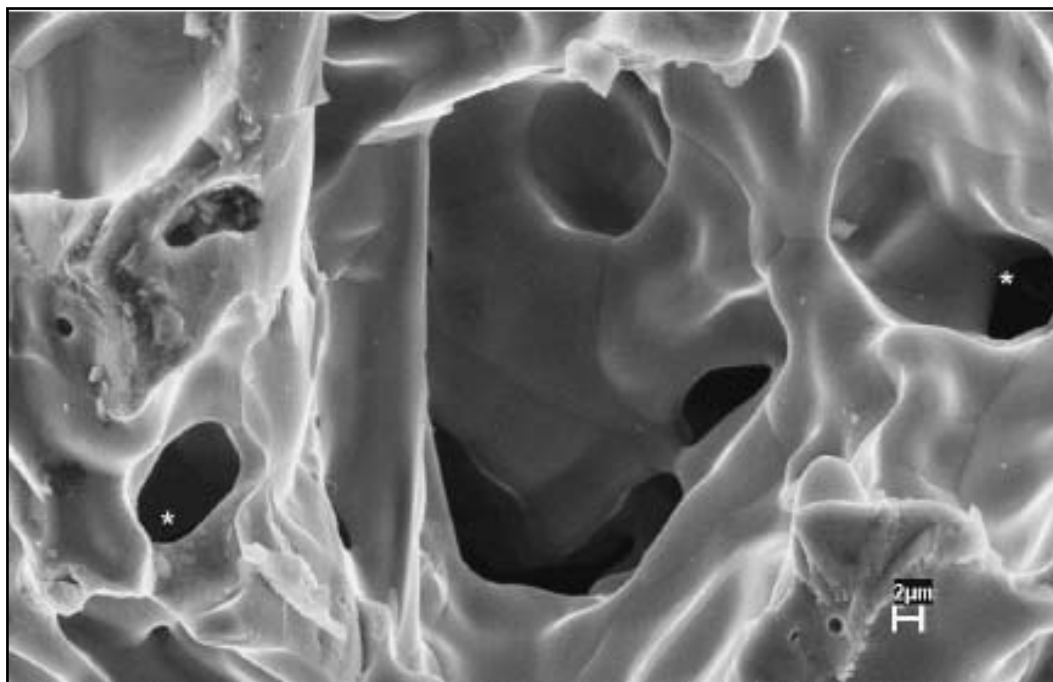


Figura 8: Eletrofotomicrografia em MEV do titânio poroso, poros (*). Aumento original de 3500 x.

5.2 Adesão celular

Houve adesão celular em todas as superfícies avaliadas e tais superfícies não influenciaram os resultados, após 24 horas de cultivo. Os valores obtidos a partir do teste de adesão celular foram submetidos ao teste estatístico *t-Student* e ANOVA um fator, o qual demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, como pode ser observado na Figura 9 e Tabelas 1 e 2. Numericamente, as amostras porosas (grupos 2 e 3) foram as que apresentaram maior quantidade de células aderidas no período avaliado. Os valores originais podem ser encontrados no apêndice 1.

Tabela 1 - **Adesão celular**. ANOVA para os dados obtidos

Efeito	gl	SQ	QM	F	p
G1 x G2 x G3	2	0.88889	0.44444	0.36	0.7095
Resíduo	6	7.33333	1.22222		
Total	8	8.22222			

Estatisticamente significativo quando $p < 0,05$

Tabela 2 - **Adesão celular**. Formação de grupos de mesmo desempenho, por meio do Teste de Tukey (5%)

	Média	Desvio-padrão	Grupo homogêneo
G1	3,0000	1,000	A
G2	3,6667	1,528	A
G3	3,6667	0,577	A

Médias seguidas de mesma letra correspondem a grupos que não diferem estatisticamente.

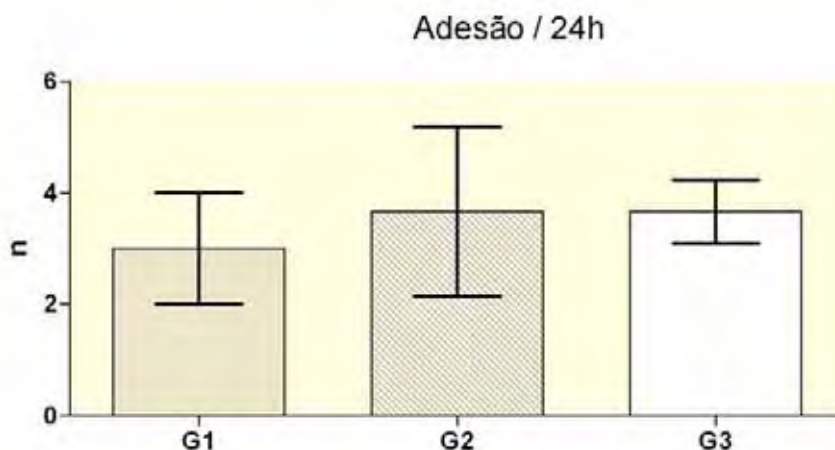


Figura 9 – **Adesão celular.** Gráfico de colunas (média $\pm$ desvio padrão) referente aos valores de adesão celular nos diferentes grupos (24 horas).

5.3 Proliferação e viabilidade celular

A influência dos três tipos de superfície das amostras, em três diferentes tempos experimentais (7, 10 e 14 dias), sobre a proliferação e viabilidade celular, constitui nove condições experimentais a serem estudadas (3 x 3). A estatística descritiva dos mesmos é representada na Figura 10.

Para determinar a influência das variáveis tipo de superfície da amostra e tempo de análise foi aplicado o teste ANOVA de dois fatores e observou-se que o tempo de análise (7, 10 e 14 dias), o tipo de superfície da amostra (G1, G2 ou G3) e a interação entre estas variáveis apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Tabela 3). Baseado nesses dados, quando se considera a influência do tempo de análise, o tipo de superfície da amostra e a interação entre eles, conclui-se que os tempos e os grupos experimentais diferem entre si, assim como a variável interação ($p = 0,0001$).

Tabela 3 – **MTT**. ANOVA para os dados obtidos

Efeito	gl	SQ	QM	F	p
Tempo	2	0.10017	0.05008	227.66	0.0001
Grupos	2	0.00845	0.00422	19.19	0.0001
Tempo x Grupo	4	0.00763	0.00191	8.67	0.0001
Resíduo	27	0.00594	0.00022		
Total	35	0.12218			

Estatisticamente significante quando $p < 0,05$

Quando se comparou as médias da proliferação e viabilidade celular considerando o efeito tempo de análise, por meio do teste de Tukey (5%), observou-se que a quantidade de células aumentou gradativamente com o tempo, sendo observada diferença estatisticamente significante. Portanto, verificou-se que a condição que promoveu maior proliferação e viabilidade celular foi o período de 14 dias (Tabela 4).

Tabela 4 – **MTT**. Teste de Tukey (5%), sob efeito da variável tempo de análise

Tempo de análise	Média	Grupos heterogêneos
14 dias	0,2082	A
10 dias	0,1073	B
7 dias	0,0878	C

Médias seguidas de letras diferentes correspondem a grupos que diferem estatisticamente.

Quando o efeito tipo de superfície das amostras foi avaliado, observou-se que a superfície que induziu a maior proliferação celular foi aquela correspondente ao grupo 2, enquanto que, a superfície que induziu a menor proliferação celular foi aquela correspondente ao grupo 1 (denso). Foi observada diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 – **MTT**. Teste de Tukey (5%), sob efeito da variável grupo experimental

Grupos experimentais	Média	Grupos heterogêneos
G1	0,1149	C
G2	0,1523	A
G3	0,1360	B

Médias seguidas de letras diferentes correspondem a grupos que diferem estatisticamente.

Quanto ao efeito interação tipo de superfície das amostras e períodos experimentais, significativa estatisticamente ($p=0,0001$), observou-se que a proliferação e viabilidade celular são dependentes do tempo de análise e da superfície da amostra, como ilustrado na Tabela 6.

Tabela 6 – **MTT**. Teste de Tukey (5%), sob efeito da variável interação tempo de análise e grupos experimentais

	Período (dias)	Média	Desvio- padrão	Grupos heterogêneos
G1	7	0,0738	0,00826	D
	10	0,1010	0,01402	CD
	14	0,1700	0,01252	B
G2	7	0,0918	0,00814	CD
	10	0,1110	0,01080	C
	14	0,2542	0,02770	A
G3	7	0,0980	0,01867	CD
	10	0,1098	0,01255	C
	14	0,2002	0,01011	B

Médias $\pm$ SD seguidas de letras diferentes correspondem a grupos que diferem estatisticamente.

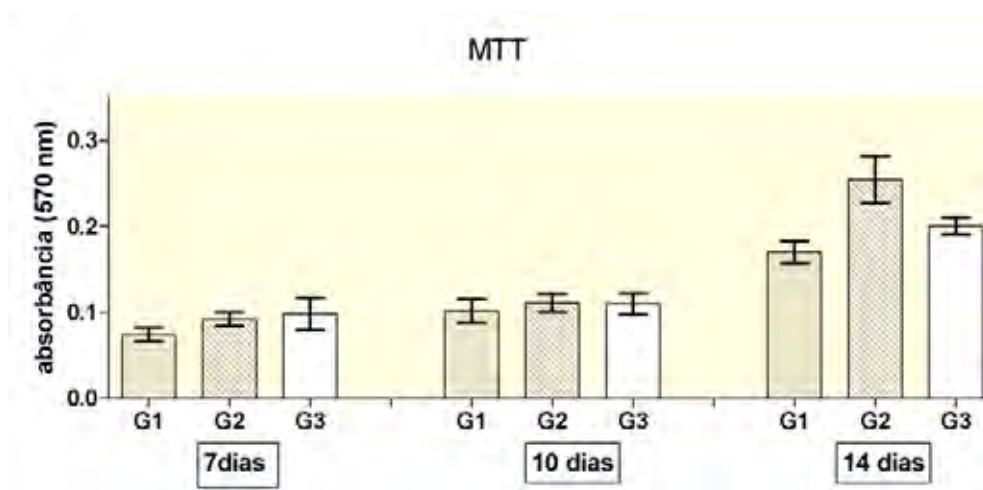


Figura 10 – **MTT**. Gráfico de colunas (média $\pm$ desvio padrão) referente aos valores de MTT nos diferentes grupos e períodos experimentais.

5.4 Conteúdo de proteína total

A influência dos três tipos de superfície das amostras, em três diferentes tempos experimentais (7, 10 e 14 dias), sobre o conteúdo de proteína total, constitui nove condições experimentais a serem estudadas (3 x 3). A estatística descritiva dos mesmos é representada nas Figuras 11 e 12.

Para determinar a influência das variáveis: tipo de superfície da amostra e tempo de análise foi aplicado o teste ANOVA de dois fatores e observou-se que o tempo de análise (7, 10 e 14 dias), o tipo de superfície da amostra (G1, G2 ou G3) e a interação entre estas variáveis apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Tabela 7). Baseado nesses dados, quando se considera a influência do tempo de análise, o tipo de superfície da amostra e a interação entre eles, conclui-se que os tempos e os grupos experimentais diferem entre si ($p = 0,0001$), assim como a variável interação ($p = 0,0086$).

Tabela 7 - **Proteína total**. ANOVA para os dados obtidos

Efeito	gl	SQ	QM	F	p
Tempo	2	0.01024	0.00512	54.70	0.0001
Grupo	2	0.01078	0.00539	57.60	0.0001
Tempo x Grupo	4	0.00178	0.00044	4.74	0.0086
Resíduo	18	0.00168	0.00009		
Total	26	0.02448			

Estatisticamente significativo quando $p < 0,05$

Quando se comparou as médias do conteúdo de proteína total, considerando o efeito tempo de análise, por meio do teste de Tukey (5%), observou-se que o conteúdo de proteína total foi maior nos períodos de 10 e 14 dias, não sendo observada diferença estatisticamente significativa nestes períodos. Entretanto, verificou-se que o período de 7 dias apresentou o menor conteúdo de proteína total, sendo estatisticamente significativo em relação aos demais tempos de análise (Tabela 8).

Tabela 8 – **Proteína total**. Teste de Tukey (5%), sob efeito da variável tempo de análise

Tempo de análise	Média	Grupos heterogêneos
14 dias	0,0898	A
10 dias	0,0851	A
7 dias	0,0463	B

Médias seguidas de letras diferentes correspondem a grupos que diferem estatisticamente.

Quando o efeito tipo de superfície das amostras foi avaliado, observou-se que o maior conteúdo de proteína total foi encontrado nas amostras do grupo 3, enquanto que, a superfície que induziu o menor conteúdo de proteína total foi aquela correspondente ao grupo 1 (denso). Foi observada diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos, conforme demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9 – **Proteína total**. Teste de Tukey (5%), sob efeito da variável grupo experimental

Grupos experimentais	Média	Grupos heterogêneos
G1	0,0479	C
G2	0,0768	B
G3	0,0966	A

Médias seguidas de letras diferentes correspondem a grupos que diferem estatisticamente.

Quanto ao efeito interação tipo de superfície das amostras e períodos experimentais, significativa estatisticamente ($p=0,0086$), observou-se que o conteúdo de proteína total é dependente do tempo de análise e da superfície da amostra, como ilustrado na Tabela 10.

Tabela 10 - **Proteína total**. Teste de Tukey (5%), sob efeito da variável interação

	Período (dias)	Média	Desvio- padrão	Grupos heterogêneos
	7	0.0310	0.01493	E
G1	10	0.0640	0.00624	CD
	14	0.0487	0.00321	DE
	7	0.0460	0.00436	DE
G2	10	0.0877	0.01365	BC
	14	0.0967	0.00321	AB
	7	0.0620	0.00889	CD
G3	10	0.1037	0.01002	AB
	14	0.1240	0.01323	A

Médias $\pm$ SD seguidas de letras diferentes correspondem a grupos que diferem estatisticamente.

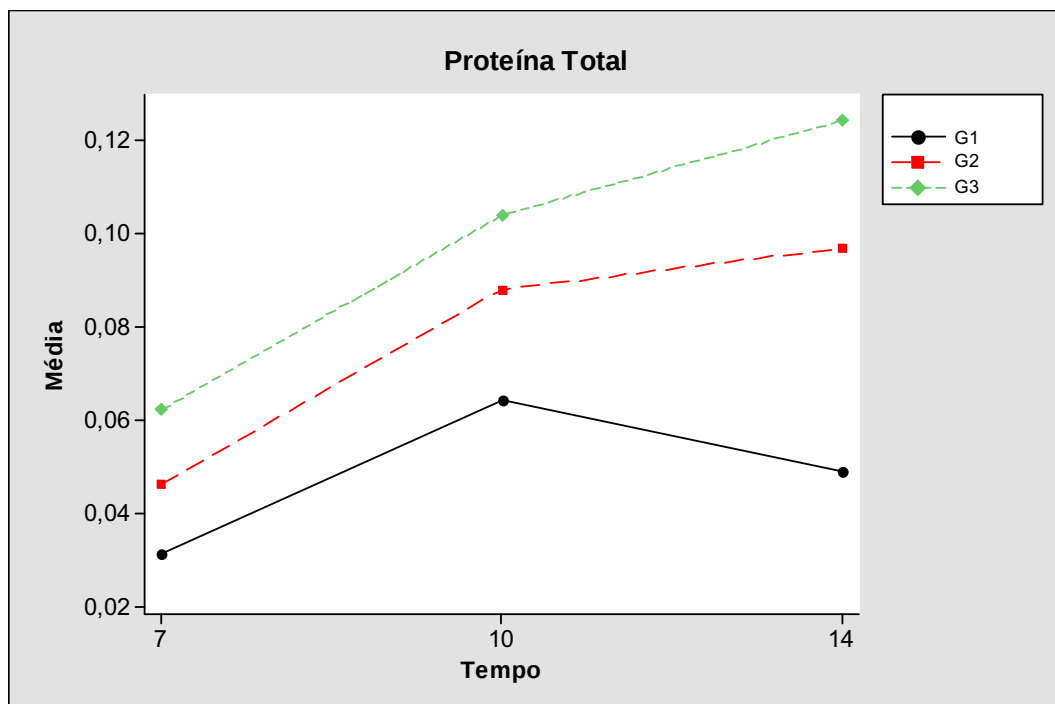


Figura 11 - Gráfico referente aos valores médios de proteína total nos diferentes grupos e períodos experimentais.

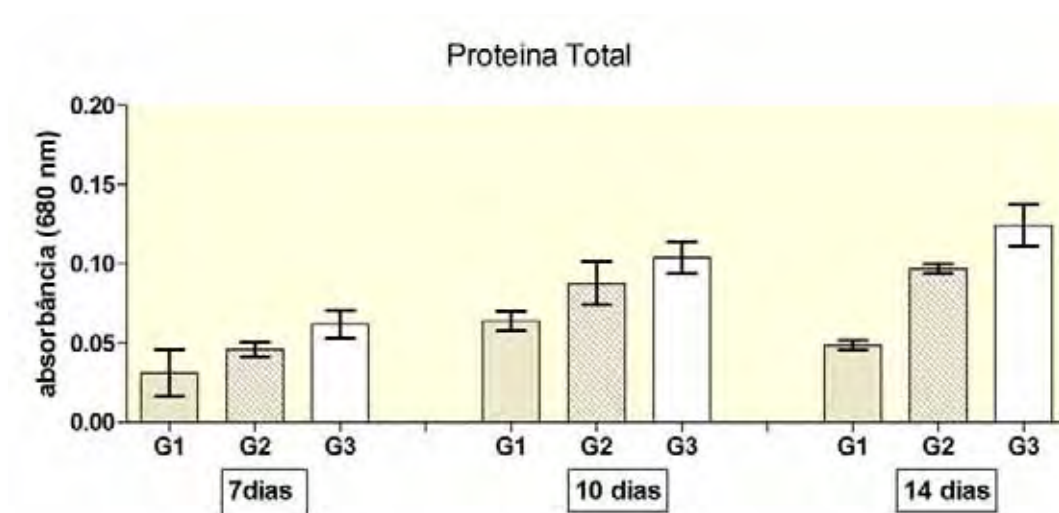


Figura 12 - Gráfico de colunas (média $\pm$ desvio padrão) referente aos valores de proteína total nos diferentes grupos e períodos experimentais.

5.5 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A influência dos três tipos de superfície das amostras, em três diferentes tempos experimentais (7, 10 e 14 dias), sobre a atividade da fosfatase alcalina, constitui nove condições experimentais a serem estudadas (3 x 3). A estatística descritiva dos mesmos é representada nas Figuras 13 e 14.

Para determinar a influência das variáveis: tipo de superfície da amostra e tempo de análise foi aplicado o teste ANOVA de dois fatores e observou-se que os tempos de análise (7, 10 e 14 dias), apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Tabela 11). Baseado nesses dados, quando se considera a influência do tempo de análise, conclui-se que estes diferem entre si ($p = 0,0001$).

Tabela 11 – **Fosfatase alcalina**. ANOVA para os dados obtidos

Efeito	gl	SQ	QM	F	p
Tempo	2	0.02809	0.01405	43.27	0.0001
Grupo	2	0.00011	0.00006	0.17	0.8412
Tempo x Grupo	4	0.00019	0.00005	0.14	0.9629
Resíduo	18	0.00584	0.00032		
Total	26	0.03424			

Estatisticamente significativo quando $p < 0,05$

Quando se comparou as médias da atividade da fosfatase alcalina, considerando o efeito tempo de análise, por meio do teste de Tukey (5%), observou-se que a atividade enzimática foi maior no período de 14 dias, sendo observada diferença estatisticamente significativa em relação aos demais períodos. Entretanto, verificou-se que os períodos de 7 e 10 dias apresentaram menor atividade da enzima, não sendo estatisticamente significativa entre eles (Tabela 12).

Tabela 12 – **Fosfatase alcalina**. Teste de Tukey (5%), sob efeito da variável tempo de análise

Tempo de análise	Média	Grupos heterogêneos
14 dias	0,1207	A
10 dias	0,0637	B
7 dias	0,0448	B

Médias seguidas de letras diferentes correspondem a grupos que diferem estatisticamente.

No entanto, quando se considera a influência do tipo de superfície da amostra (G1, G2 ou G3), por meio do teste ANOVA (Tabela 11), não se observa diferença estatisticamente significativa ($p=0,8412$). O mesmo é observado no efeito interação tempo de análise e grupos experimentais ($p=0,9629$). Desta forma, a atividade da fosfatase alcalina não se mostrou dependente da superfície da amostra e de sua interação com o período experimental (Tabela 13).

Tabela 13 – **Fosfatase alcalina**. Teste de Tukey (5%), sob efeito da variável interação

	Período (dias)	Média	Desvio- padrão	Grupos heterogêneos
G1	7	0.0437	0.00057	C
	10	0.0647	0.00379	BC
	14	0.1137	0.0358	AB
G2	7	0.0440	0.00100	C
	10	0.0633	0.00802	BC
	14	0.1210	0.00872	A
G3	7	0.0467	0.00208	C
	10	0.0630	0.00656	BC
	14	0.1273	0.0379	A

Médias $\pm$ SD seguidas de letras diferentes correspondem a grupos que diferem estatisticamente.

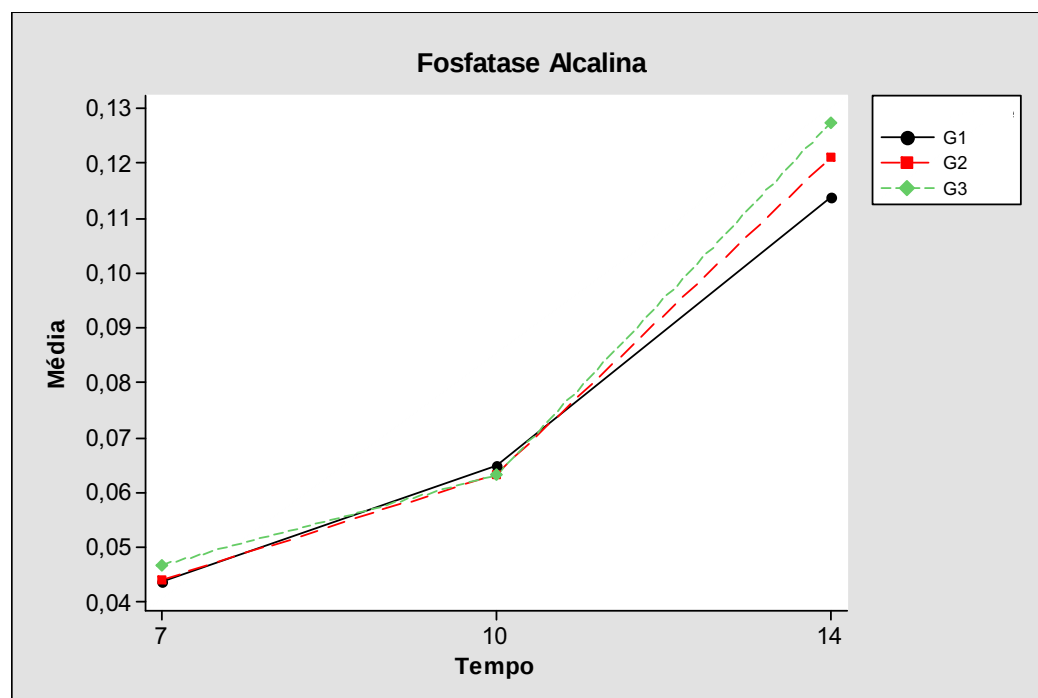


Figura 13 - Gráfico referente aos valores médios de fosfatase alcalina nos diferentes grupos e períodos experimentais.

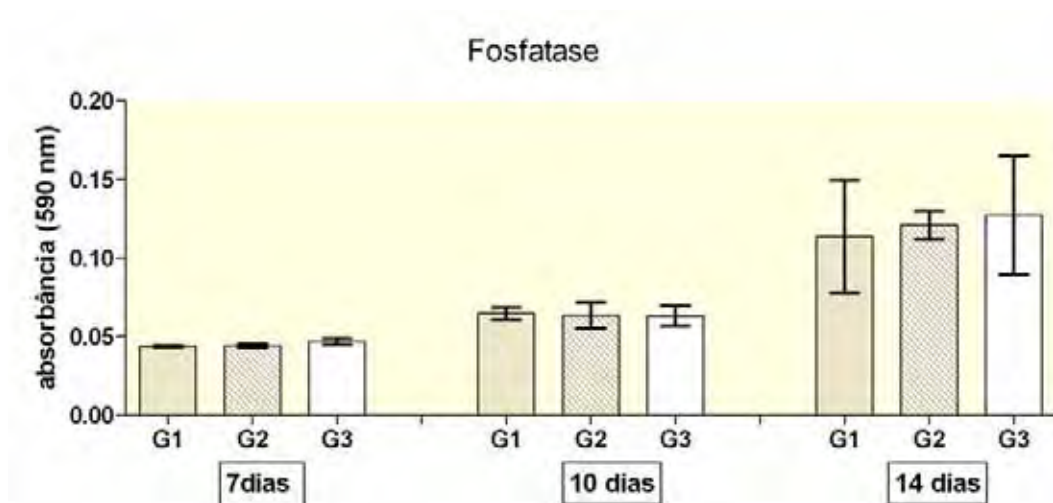


Figura 14 - Gráfico de colunas (média $\pm$ desvio padrão) referente aos valores de atividade de fosfatase alcalina nos diferentes grupos e períodos experimentais.

5.6 Quantificação de formações nodulares de matriz mineralizada

A influência dos três tipos de superfície das amostras, em três diferentes tempos experimentais (7, 10 e 14 dias), sobre a formação de matriz nodular mineralizada, constitui nove condições experimentais a serem estudadas (3 x 3). A estatística descritiva dos mesmos é representada nas Figuras 15 e 16.

Para determinar a influência das variáveis: tipo de superfície da amostra e tempo de análise foi aplicado o teste ANOVA de dois fatores e observou-se que o tempo de análise (7, 10 e 14 dias), o tipo de superfície da amostra (G1, G2 ou G3) e a interação entre estas variáveis apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Tabela 14). Baseado nesses dados, quando se considera a influência do tempo de análise, o tipo de superfície da amostra e a interação entre eles, conclui-se que os tempos e os grupos experimentais diferem entre si, assim como a variável interação ($p = 0,0001$).

Tabela 14 – **Nódulos de mineralização**. ANOVA para os dados obtidos

Efeito	gl	SQ	QM	F	p
Tempo	2	6,014	3,006	28,83	0,00001
Grupo	7	266,522	38,074	364,99	0,00001
Tempo x Grupo	14	10,891	0,777	7,46	0,00001
Resíduo	264	27,539	0,104		
Total	287	310,966			

Estatisticamente significativo quando $p < 0,05$

Quando se comparou as médias da quantidade de matriz mineralizada formada, considerando o efeito tempo de análise, por meio do teste de Tukey (5%), observou-se maior formação nos períodos de 10 e 14 dias, não sendo observada diferença estatisticamente significativa nestes períodos. Entretanto, verificou-se que o período de 7 dias apresentou a menor formação, sendo estatisticamente significativa em relação aos demais tempos de análise (Tabela 15).

Tabela 15 – **Nódulos de mineralização**. Teste de Tukey (5%), sob efeito da variável tempo de análise

Tempo de análise	Média	Grupos heterogêneos
14 dias	1,19	A
10 dias	1,09	A
7 dias	0,85	B

Médias seguidas de letras diferentes correspondem a grupos que diferem estatisticamente.

Quando o efeito tipo de superfície das amostras foi avaliado, observou-se que a superfície que induziu a maior formação de matriz nodular mineralizada foi aquela correspondente ao grupo 3, enquanto que, a superfície que induziu a menor formação foi aquela correspondente ao grupo 1, seguida pelas amostras do grupo 2. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo 3 e os demais, conforme demonstrado na tabela 16.

Tabela 16 – **Nódulos de mineralização**. Teste de Tukey (5%), sob efeito da variável grupo experimental

Grupos experimentais	Média	Grupos heterogêneos
G3	0,56	A
G2	0,19	B
G1	0,06	B

Médias seguidas de letras diferentes correspondem a grupos que diferem estatisticamente.

Quanto ao efeito interação tipo de superfície das amostras e períodos experimentais, significativa estatisticamente ($p=0,0001$), observou-se que a formação de matriz mineralizada é dependente do tempo de análise e da superfície da amostra, como ilustrado na Tabela 17.

Tabela 17 - **Nódulos de mineralização**. Teste de Tukey (5%), sob efeito da variável interação

	Período (dias)	Média	Desvio- padrão	Grupos heterogêneos
G1	7	0.0387	0.01737	A
	10	0.0541	0.00448	A
	14	0.0944	0.03428	A
G2	7	0.1907	0.0632	A
	10	0.1777	0.0645	A
	14	0.2158	0.0922	A
G3	7	0.4771	0.1264	AB
	10	0.5124	0.1000	AB
	14	0.6982	0.2042	B

Médias $\pm$ SD seguidas de letras diferentes correspondem a grupos que diferem estatisticamente.

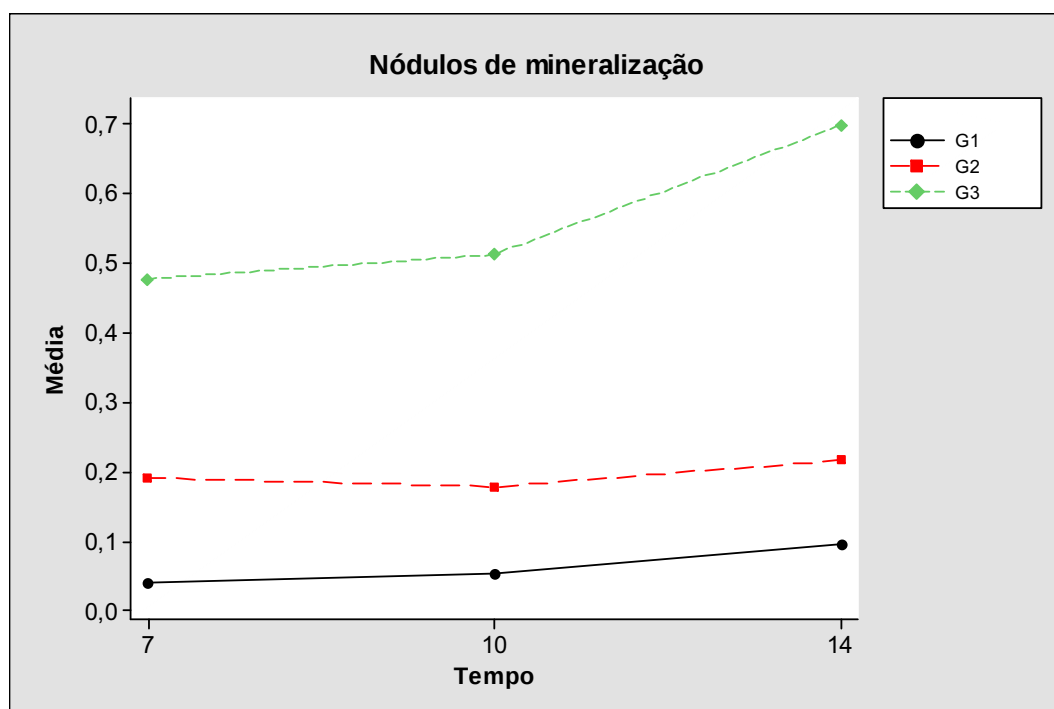


Figura 15 - Gráfico referente aos valores médios de matriz mineralizada nos diferentes grupos e períodos experimentais.

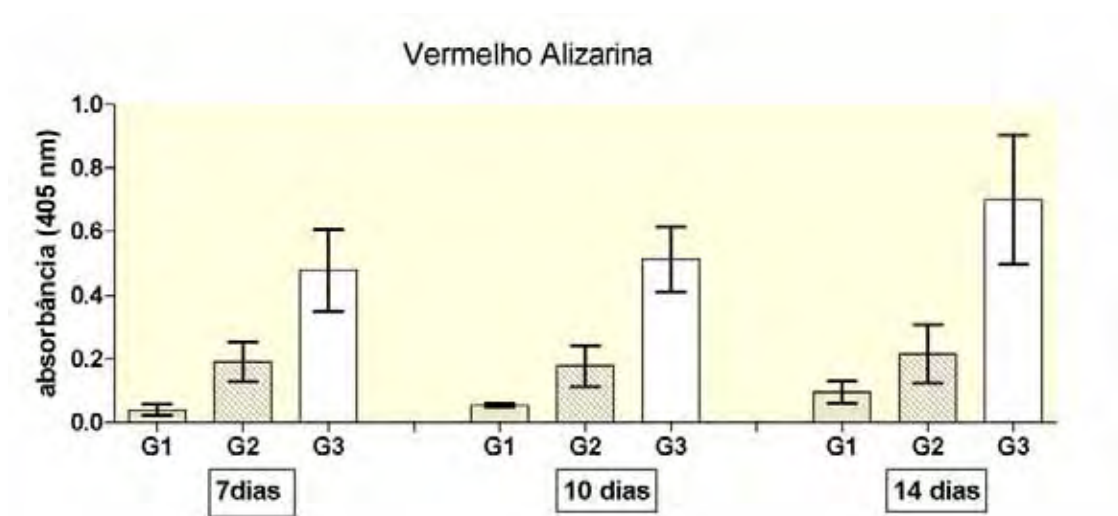


Figura 16 - Gráfico de colunas (média $\pm$ desvio padrão) referente aos valores referente aos valores de matriz nodular mineralizada nos diferentes grupos e períodos experimentais.

6 DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar e comparar a resposta de células osteogênicas cultivadas em amostras de titânio densas e com diferentes porosidades, confeccionadas pela técnica de metalurgia do pó.

Os resultados obtidos mostraram que todas as superfícies permitiram a adesão e proliferação celular, além da diferenciação osteoblástica expressada pela atividade de fosfatase alcalina e formação de matriz nodular mineralizada. Os testes de proliferação e viabilidade celular, conteúdo de proteína total e formação de matriz nodular mineralizada, demonstraram que os grupos com superfície porosa tiveram melhores resultados em relação às amostras com superfície densa, isto é houve diferença estatisticamente significativa nos resultados. Nos testes de adesão celular e atividade da fosfatase alcalina esta relação não foi observada, uma vez que não houve diferença estatística nos resultados, quando comparada a variável tipo de superfície.

As características de superfície dos implantes osseointegrados interferem diretamente no processo de osseointegração. O comportamento celular na interface osso-implante está relacionado a características da superfície do implante, como composição química, energia de superfície e microtopografia. Tais características irão determinar quais proteínas serão adsorvidas, a quantidade e a orientação que assumirão na superfície. Consequentemente, os fenômenos de recrutamento, adesão, proliferação e diferenciação celular também serão influenciados. Portanto, as propriedades do material atuam diretamente na adesão de osteoblastos ou indiretamente, como resultado da interação com proteínas da matriz extracelular, proteínas de membrana e do citoesqueleto, que irão intermediar a adesão celular. A adesão e

espalhamento celular pertencem à primeira fase da interação organismo-implante e a forma como esses fenômenos ocorrem influenciarão as fases seguintes de proliferação e diferenciação. Desta forma, alterações na superfície, que resultem em maior área de contato, resultarão em maior adsorção de proteínas, favorecendo a adesão e o espalhamento celular (Boyan et al., 1996; Kasemo; Lausmaa, 1988; Anselme, 2000; Diniz et al., 2002; Anselme; Bigerelle, 2005; Zinger et al., 2005; Moura et al., 2007; Le Guéhennec et al., 2007; Nebe et al., 2007; Le Guéhennec et al., 2008; Oliva et al., 2009; Lamolle et al., 2009).

Os locais de adesão de células de cultura à superfície de materiais são denominados contatos focais e ocorrem, essencialmente, em células de baixa mobilidade. Nestes contatos, a distância entre a superfície do material e a membrana celular é de 10-15 nm e é raramente observado *in vivo*. A face externa dos contatos focais apresenta receptores de superfície, como as integrinas. Na face interna, proteínas como a vinculina e talina são responsáveis pela interação com proteínas do citoesqueleto (filamentos de actina) e os receptores de membrana (integrinas). Através dos contatos focais, as informações do meio extracelular são transferidas para a célula, via integrinas, resultando na transcrição de genes e síntese de novas proteínas. Em situações *in vitro* a formação de contatos focais é promovida por proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina. Estudos mostraram diferenças na distribuição dos contatos focais em diferentes superfícies. Nas superfícies lisas os contatos focais eram distribuídos, uniformemente, em toda superfície da membrana celular que estava em contato com o substrato, permitindo maior espraiamento. Por outro lado, nas superfícies rugosas esses contatos eram visíveis apenas nas extremidades dos prolongamentos celulares ou filopódios, nos quais a membrana celular estava em contato com a superfície testada, permitindo a adesão nas irregularidades da superfície (Groessner-Schreiber; Tuan., 1992; Anselme, 2000; Lamolle et al., 2009). Portanto, o tipo de adesão focal e

sua geometria determinam a conformação celular e, conseqüentemente, sua expressão fenotípica.

Outros estudos que também avaliaram a influência da rugosidade de superfície em amostras de Ti6Al4V sobre a adesão de osteoblastos humanos observaram uma relação diretamente proporcional entre a rugosidade e a adesão celular. Análises imunohistoquímicas mostraram maior organização de citoesqueleto e maior espalhamento celular nas amostras rugosas (Sinha et al., 1994; Anselme, 2000; Anselme; Bigerelle, 2005; Lamolle et al., 2009).

A morfologia celular também sofre influência da topografia da superfície. A migração, adesão e proliferação de osteoblastos são favorecidas em superfícies com poros de 200 µm a 400 µm de diâmetro. A curvatura desses poros causaria compressão e tensão ideais nos mecanorreceptores da membrana celular (Dennis et al., 1992; Ripamonti et al., 2008). Estudos *in vitro*, que realizaram cultura de osteoblastos, demonstraram a maior expressão de genes relacionados à síntese de proteínas da matriz, como colágeno tipo I, sialoproteína óssea e osteopontina, além de maior proliferação dessas células (Boyan et al., 1996; Zinger et al., 2005; Masaki et al., 2005; Nebe et al., 2007).

No presente estudo, a presença de poros interconectados, obtidos pela técnica de metalurgia do pó, influenciou diretamente os resultados obtidos. Isto pode ser explicado pelo aumento da área de contato da superfície, permitindo a adsorção de maior quantidade de proteínas e células osteogênicas, que resultará em maior quantidade de neoformação óssea (Deporter et al., 1996; Deporter et al., 1999; Deporter et al., 2001; Deporter et al., 2002, Wen et al., 2002; Brentel et al., 2006) e pelo diâmetro médio dos poros de 300 µm, que favoreceram a expressão fenotípica osteoblástica. Além disso, a interligação dos poros, como observado na análise metalográfica descritiva, permitiria o crescimento ósseo para o interior do implante ou *bone ingrowth* (Kienapfel et al., 1999). Este fator resulta em maior imbricamento mecânico e maior

resistência na interface osseointegrada (Cook; Rust-Darwicki, 1995; Deporter et al., 1999; Deporter et al., 2001; Deporter et al., 2002; Diniz et al., 2002; Brentel et al., 2006; Vasconcellos et al., 2008).

Apesar de não diferir estatisticamente, os valores de adesão celular nas amostras dos grupos porosos (G2 e G3) foram maiores em relação às amostras densas (G1), após 24 horas de observação. A presença da rede interligada de poros resultou em um aumento na área de superfície, o que pode ter resultado em maior adsorção de proteínas, como a fibronectina e, conseqüentemente, propiciou um maior recrutamento celular, resultando em um maior número de células aderidas após o período experimental de 24 horas.

Os resultados referentes à viabilidade e proliferação celular, que foram obtidos a partir da análise de MTT, revelaram proliferação celular em todas as superfícies estudadas. Entretanto, houve diferenças significantes entre os grupos, tendo as amostras do grupo 2 os melhores resultados, excetuando-se o período de sete dias, em que as amostras do grupo 3 obtiveram maiores taxas de proliferação. Desta forma, as porosidades presentes nas amostras favoreceram o crescimento celular. As mesmas observações foram encontradas em outros estudos nos quais houve relação direta da rugosidade da superfície e a proliferação celular (Groessner-Schreiber; Tuan., 1992; Diniz et al., 2002; Anselme; Bigerelle, 2005; Moura et al., 2007; Le Guéhenec et al., 2007; Nebe et al., 2007; Lamolle et al., 2009). Além disso, a maior área de superfície existente nas amostras porosas, especialmente a comunicação entre os poros, podem ter permitido que a proliferação ocorresse durante um maior período.

A diferenciação da célula osteoblástica, geralmente, implica em atividade da fosfatase alcalina (ALP), expressão de proteínas específicas como osteocalcina, osteopontina, osteonectina, colágeno tipo I, sialoproteína óssea e formação de matriz mineralizada. Com relação à atividade da fosfatase alcalina, não houve diferença estatisticamente

significante entre as superfícies estudadas. Contudo, observou-se um aumento da atividade enzimática no decorrer dos períodos experimentais, sendo os valores no período de 14 dias os mais elevados e estatisticamente significantes em relação aos tempos de sete e dez dias. A explicação para este aumento na atividade enzimática está na relação inversa entre proliferação e diferenciação celular, isto é, células em atividade proliferativa tendem a ter menor atividade enzimática, enquanto que, células diferenciadas apresentam maior atividade, como resultado da expressão do fenótipo osteoblástico (Boyan et al., 1996; Diniz et al., 2002; Rosa; Belotti, 2003; Zinger et al., 2005; Moura et al., 2007; Le Guéhennec et al., 2007; Oliva et al., 2009; Lamolle et al., 2009). Após 14 dias de cultivo celular, o número de células em estágios mais diferenciados foi significativamente maior e, portanto, a atividade enzimática também. Portanto, a topografia da superfície não acelerou a diferenciação das células da calvária de ratos recém-nascidos, uma vez que não foi encontrada diferença na atividade da fosfatase alcalina entre os grupos experimentais. Outros estudos observaram diminuição da atividade da fosfatase alcalina em superfícies rugosas, quando da utilização de células similares a osteoblastos humanos (SaOS2) e creditaram isso ao fato dessas células serem provenientes de linhagens celulares imortalizadas de osteossarcomas, o que representaria um estágio menos diferenciado de maturação osteoblástica (Boyan et al., 1996; Anselme, 2000).

Considerando os índices de proteína total, os valores observados em todas as amostras porosas foram os mais altos; quando comparados com as amostras densas. Especificamente, as amostras do grupo 3, foram aquelas que exibiram maiores valores no conteúdo de proteína total, sendo observada diferença estatisticamente significativa com relação aos outros grupos. Provavelmente, a presença da rede de poros interligados e o conseqüente aumento na área de superfície favoreceram a adesão e proliferação de um maior número de células, que a partir do avanço no processo de diferenciação, aumentaram a atividade

de síntese protéica. A síntese da matriz extracelular, em resposta às diferentes características de superfície, contribui para a inibição da proliferação e maior diferenciação (Anselme, 2000; Rosa; Belotti, 2003; Zinger et al., 2005; Moura et al., 2007; Le Guéhennec et al., 2007; Lamolle et al., 2009).

A formação de matriz mineralizada também é um importante indicador da diferenciação osteoblástica, uma vez que expressa a atividade nata do osteoblasto, que é a síntese de matriz extracelular para posterior mineralização. Nesse trabalho foi utilizado um método semi-quantitativo para avaliar a quantidade da matriz mineralizada formada em cada amostra, que considera a quantidade do corante Vermelho Alizarina nas superfícies avaliadas (Gregory et al., 2004). Houve aumento na quantidade de matriz formada no decorrer dos períodos experimentais e as amostras do grupo 3 foram as que apresentaram os maiores índices. Diversos estudos mostraram que o aumento da rugosidade da superfície leva a um aumento da diferenciação osteoblástica *in vitro* (Boyan et al., 1996; Groessner-Schreiber; Tuan., 1992; Diniz et al., 2002; Rosa; Belotti, 2003; Zinger et al., 2005; Moura et al., 2007; Le Guéhennec et al., 2007; Lamolle et al., 2009) e ao aumento de formação óssea *in vivo* (Frosch et al., 2003; Vasconcellos et al., 2008).

A digestão enzimática da calvária de ratos recém-nascidos propicia o isolamento de uma população celular heterogênea, composta por células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e fibroblastos. Sobre condições favoráveis para células osteogênicas, como as utilizadas nesse estudo, células osteoprogenitoras da cultura primária passam a se diferenciar em osteoblastos. O aumento da síntese protéica, da atividade de fosfatase alcalina e a formação de matriz mineralizada expressam o fenótipo osteoblástico (Nanci et al., 1996; Oliveira et al., 2003; Zinger et al., 2005; Oliva et al., 2009). Os maiores valores de matriz mineralizada encontrados nas amostras porosas podem representar uma influência

direta no recrutamento de células osteoprogenitoras e na diferenciação em osteoblastos (Moura et al., 2007).

Com relação à utilização de implantes porosos, nos quais existe interligação desses poros, ao invés de implantes com rugosidades na superfície, o objetivo é promover uma fixação mais estável destes com os tecidos. A forma geométrica de poros interligados não é realizada apenas para aumentar a área de contato, mas também para permitir o crescimento do tecido ósseo para o seu interior, inclusive dos poros mais centrais, produzindo uma rede tridimensional que conduz ao imbricamento mecânico e interdigitação do tecido ósseo com o implante, levando a uma maior estabilidade e área de osseointegração.

Dentre os vários procedimentos utilizados para a confecção de poros na superfície do implante, a metalurgia do pó está entre as poucas técnicas capazes de produzir amostras que exibem estruturas complexas como o formato de rede, característica essencial para os implantes com poros interligados (Bram et al., 2000; Wen et al., 2002; Oliveira et al., 2002). Os poros produzidos pela metalurgia do pó, apresentam aspecto tridimensional interligado em toda a sua espessura, permitindo o crescimento do tecido ósseo para o interior dos mesmos (Brentel et al., 2006; Vasconcellos et al., 2008). A intercomunicação entre os poros é essencial para que ocorra o entrelaçamento da estrutura porosa com o osso, atingindo a máxima resistência interfacial em um menor período de tempo. Além disso, esta técnica apresenta vantagens em relação às técnicas convencionais de metalurgia, tais como controle da composição química, a economia de matéria prima, redução de custo de fabricação, redução no número de etapas complementares para a produção das amostras e controle da porcentagem e diâmetro dos poros através da seleção do espaçador (Pilliar, 1998; Oliveira et al., 2002; Vasconcellos et al., 2008).

A influência da porosidade e do tamanho dos poros na proliferação de células ósseas também é motivo de estudo, porém ainda

não existe um consenso com relação ao tamanho ideal destes poros. A maioria dos estudos relata uma faixa de diâmetro ideal dos poros que varia entre 100 μm a 500 μm (Bobyne et al., 1987; Dallant et al., 1987; Pilliar, 1998; Deporter et al., 1999; Deporter et al., 2002; Brentel et al., 2006; Li et al., 2007; Vasconcellos et al., 2008). Entretanto, os estudos de Nguyen et al. (2004) e de Frosch et al. (2002) relataram, respectivamente, que poros pequenos exibindo apenas 45 μm ou poros grandes com 1000 μm também conseguem promover o crescimento ósseo para o seu interior.

Por outro lado, a estrutura porosa não deve comprometer a resistência do implante, uma vez que este será submetido a diversas forças e os poros necessários para a proliferação do tecido ósseo podem resultar em efeitos deletérios a propriedade mecânica do material (Thieme et al., 2001; Wen et al., 2001; Li et al., 2007; Vasconcellos et al., 2008). O gradiente máximo de porosidade deve ser ajustado apropriadamente, considerando a taxa de porosidade e o tamanho dos poros, para que a estrutura porosa apresente adequada resistência mecânica. Takemoto et al. (2005) e Vasconcellos et al. (2008) utilizaram implantes com 40% e 37% de porosidade, respectivamente, e obtiveram bons resultados nos testes mecânicos.

A presença de poros nos implantes também cria a possibilidade de equilíbrio entre a dureza do osso e a do metal, uma vez que os valores de elasticidade do material aproximam-se dos valores do tecido ósseo, ao mesmo tempo em que a resistência não é prejudicada (Pilliar, 1998; Deporter et al., 1999). A superfície porosa preenchida com osso torna-se uma importante área de transição entre o titânio e o osso. Este gradiente evita que ocorra a reabsorção do tecido ósseo devido à diferença entre os módulos de elasticidade na interface cortical óssea (80 a 200 MPa) e titânio denso (450 a 900 MPa). Segundo Bobyne et al. (1999) a deformação de materiais porosos contra a extremidade de tecido ósseo sem que ocorra a fragmentação dos mesmos, indica material com

adequada elasticidade e ductilidade, propriedades que poderiam auxiliar a melhorar a fricção e adaptação inicial, além de facilitar o completo assentamento do implante, reduzindo também a chance de fratura do tecido ósseo.

Diante do exposto, pode-se verificar a influência direta da topografia da superfície das amostras estudadas, que favoreceu a adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos provenientes da calvária de ratos recém-nascidos.

A correlação dos dados de pesquisas *in vitro*, que buscam compreender os fenômenos bioquímicos e celulares da osseointegração, com as pesquisas *in vivo*, que consideram fatores individuais, como localização (maxila ou mandíbula), carga aplicada, fadiga do material, idade, e comportamento frente aos fluídos corporais, podem melhorar os resultados clínicos obtidos até hoje ou possibilitar a utilização em situações críticas. Uma importante possibilidade dos implantes porosos seria a utilização em áreas com deficiências ósseas em altura, uma vez que implantes porosos curtos seriam capazes de fornecer uma área adequada de osseointegração.

7 CONCLUSÃO

Frente à metodologia empregada nesse trabalho e os resultados obtidos é lícito concluir que a alteração da superfície de implantes osseointegrados, através da confecção de poros interligados pela técnica da metalurgia do pó, favorece a adesão, proliferação e diferenciação de células osteogênicas. A maior proporção de porosidade parece beneficiar a diferenciação celular.

REFERÊNCIAS*

Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981;52(2):155-70.

Anselme K, Bigerelle M. Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. *Acta Biomater*. 2005 Mar;1(2):211-22.

Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000 Apr;21(7):667-81.

Aparicio C, Gil FJ, Planell JA, Engel EI. Human-osteoblast proliferation and differentiation on grit-blasted and bioactive titanium for dental applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Dec;13(12):1105-11.

Bellinati CE. Obtenção e caracterização do Ti e suas ligas por metalurgia do pó. [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Engenharia Aeronáutica e Mecânica,(SP): ITA; 1999.

Boyn D, Engh CA, Pilliar RM. Histological comparison of biological fixation and bone modeling with canine and human porous-coated hip prostheses. In: American Society for Testing Materials ASTM953: Quantitative characterization and performance of porous implants for hard tissue applications. Philadelphia: ASTM; 1987.p.185-206.

Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992;7(3):302-10.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*. 1996 Jan;17(2):137-46.

Bram M. High-porosity titanium, stainless steel, and superalloy parts. *Adv Eng Mater*. 2000, 2(4):196-9.

Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent*. 1983 Sep;50(3):399-410.

Brentel AS, Vasconcellos LM, Oliveira MV, Graça ML, Vasconcellos LG, Cairo CA, et al. Histomorphometric analysis of pure titanium implants with porous surface versus rough surface. *J Appl Oral Sci*. 2006 Jun;14(3):213-8.

Briggs EP, Walpole AR, Wilshaw PR, Karlsson M, Palsgard E. Formation of highly adherent nano-porous alumina on Ti-based substrates: a novel bone implant coating. *J Mater Sci Mater Med*. 2004 Sep;15(9):1021-9.

Brunette DM. The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1988;3(4):231-46.

Brunski JB, Puleo DA, Nanci A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000 Jan-Feb;15(1):15-46.

Cassinelli C, Morra M, Bruzzzone G, Carpi A, Di Santi G, Giardino R, et al. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 2. In vitro experiments. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003 Jan-Feb;18(1):46-52.

Cheng X, Li Y, Zuo Y, Zhang L, Li J, Wang H. Properties and *in vitro* biological evaluation of nano-hydroxyapatite/chitosan membranes for bone guided regeneration. *Mater Sci Eng C*. 2009;29:29-35.

Cook SD, Rust-Dawicki AM. In vivo evaluation of a CSTi dental implant: a healing time course study. *J Oral Implantol*. 1995;21(3):82-90.

Dallant P. Quantitation of bone ingrowth into porous implants submitted to pulsed eletromagnetic fields. In: American Society for Testing Materials ASTM953: Quantitative charaterization and performance of porous implants for hard tissue applications. Philadelphia: ASTM; 1987.p.286-300.

de Bruijn JD, van den Brink I, Mendes S, Dekker R, Bovell YP, van Blitterswijk CA. Bone induction by implants coated with cultured osteogenic bone marrow cells. *Adv Dent Res*. 1999 Jun;13:74-81.

Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant*. 1992;1(1):23-32.

Deporter DA, Pilliar RM, Todeskian R. Managing the posterior mandible of partially edentulous patients with short, porous-surfaced dental implants: early data from a clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001 Sep-Oct;16(5):653-8.

Deporter DA, Todeskian R, Nardini K. Use of a tapered, porous-surfaced dental implant in combination with osteotomes to restore edentulism in the difficult maxilla. *Implant Dent*. 1999;8(3):233-40.

Deporter DA, Todeskian R, Riley N. Porous-surfaced dental implants in the partially edentulous maxilla: assessment for subclinical mobility. *Int J Period Restor Dent*. 2002 Apr;22(2):184-92.

Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM, Chipman ML, Valiquette N. A histological comparison in the dog of porous coated vs: threaded dental implants. *J Dent Res*. 1990 May;69(5):1138-45.

Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM, Melcher AH, Winslow J, Howley TP, et al. A histological assessment of the initial healing response adjacent to porous-surfaced, titanium alloy dental implants in dogs. *J Dent Res*. 1986 Aug;65(8):1064-70.

Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM, Pharoah M, Smith DC, Chipman M, et al. A prospective clinical study in humans of an endosseous dental implant partially covered with a powder-sintered porous coating: 3- to 4-year results. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996 Jan-Feb;11(1):87-95.

Diniz MG, Soares GA, Coelho MJ, Fernandes MH. Surface topography modulates the osteogenesis in human bone marrow cell cultures grown on titanium samples prepared by a combination mechanical and acid treatments. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Apr;13(4):421-32.

Ducheyne P, Cuckler JM. Flexible porous titanium for revision surgery: concept and initial data. In: American Society for Testing Materials ASTM953: Quantitative characterization and performance of porous implants for hard tissue applications. Philadelphia: ASTM; 1987. p.303-14.

Ellingsen JE. Surface configurations of dental implants. *Periodontology* 2000. 1998 Jun;17:36-46.

Fang B, Wan YZ, Tang TT, Gao C, Dai KR. Proliferation and Osteoblastic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells on Hydroxyapatite/Bacterial Cellulose Nanocomposite Scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2009 Jan;15(1):1-8.

Fini M, Savarino L, Nicoli Aldini N, Martini L, Giavaresi G, Rizzi G, et al. Biomechanical and histomorphometric investigations on two morphologically differing titanium surfaces with and without fluorhydroxyapatite coating: an experimental study in sheep tibiae. *Biomaterials*. 2003 Aug;24(19):3183-92.

Frosch KH. Migration, matrix production and lamellar bone formation of human osteoblast-like cells in porous titanium implants. *Cells Tissues Organs*. 2002, 170(4):214-27.

Frosch KH, Sondergeld I, Dresing K, Rudy T, Lohmann CH, Rabba J, et al. Autologous osteoblasts enhance osseointegration of porous titanium implants. *J Orthop Res*. 2003 Mar;21(2):213-23.

Galli C, Guizzardi S, Passeri G, Martini D, Tinti A, Mauro G, et al. Comparison of human mandibular osteoblasts grown on two commercially available titanium implants surfaces. *J Periodontol*. 2005 Mar;76(3):364-72.

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004 Jun 1;329(1):77-84.

Groessner-Schreiber B, Tuan RS. Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces in vitro. *J Cell Sci*. 1992 Jan;101 (Pt 1):209-17.

Guizzardi S, Galli C, Martini D, Belletti S, Tinti A, Raspanti M, et al. Different titanium surface treatment influences human mandibular osteoblast response. *J Periodontol*. 2004 Feb;75(2):273-82.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992 Apr 3;69(1):11-25.

Irie K, Zalzal S, Ozawa H, McKee MD, Nanci A. Morphological and immunocytochemical characterization of primary osteogenic cell cultures derived from fetal rat cranial tissue. *Anat Rec*. 1998 Dec;252(4):554-67.

Kanagaraja S, Wennerberg A, Eriksson C, Nygren H. Cellular reactions and bone apposition to titanium surfaces with different surface roughness and oxide thickness cleaned by oxidation. *Biomaterials*. 2001 Jul;22(13):1809-18.

Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. *J Prosthet Dent*. 1983 Jun;49(6):832-7.

Kasemo B, Lausmaa J. Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1988 Winter;3(4):247-59.

Kienapfel H, Spray C, Wilke A, Griss P. Implant fixation by bone ingrowth. *J Arthroplasty*. 1999 Apr;14(3):355-68.

Knabe C, Klar F, Fitzner R, Radlanski RJ, Gross U. In vitro investigation of titanium and hydroxyapatite dental implant surfaces using a rat bone marrow stromal cell culture system. *Biomaterials*. 2002 Aug;23(15):3235-45.

Lamolle SF, Monjo M, Rubert M, Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE. The effect of hydrofluoric acid treatment of titanium surface on nanostructural and chemical changes and the growth of MC3T3-E1 cells. *Biomaterials*. 2009 Feb;30(5):736-42.

Le Guehennec L, Lopez-Heredia MA, Enkel B, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomater*. 2008 May;4(3):535-43.

Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*. 2007 Jul;23(7):844-54.

Lee TM, Tsai RS, Chang E, Yang CY, Yang MR. The cell attachment and morphology of neonatal rat calvarial osteoblasts on the surface of Ti-6Al-4V and plasma-sprayed HA coating: Effect of surface roughness and serum contents. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Apr;13(4):341-50.

Li Y, Rong L, Li Y. Pore characteristics of porous NiTi alloy fabriacted by combustion synthesis. *J Alloys Compounds*. 2001;325:259-62.

Lodish HF, Hilton DJ, Klingmüller U, Watowich SS, Wu H. The erythropoietin receptor: biogenesis, dimerization, and intracellular signal transduction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1995;60:93-104.

Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement: a materials science perspective. *Biomaterials*. 1998 Sep;19(18):1621-39.

Lumbikanonda N, Sammons R. Bone cell attachment to dental implants of different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001 Sep-Oct;16(5):627-36.

Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clin Oral Implants Res.* 2005 Dec;16(6):650-6.

Morra M, Cassinelli C, Bruzzzone G, Carpi A, Di Santi G, Giardino R, et al. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 1. Surface analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003 Jan-Feb;18(1):40-5.

Moura J, Teixeira LN, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, Beloti MM, et al. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate). *J Biomed Mater Res A.* 2007 Sep 1;82(3):545-57.

Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez BS, Arvidson K. Determining optimal surface roughness of TiO(2) blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Implants Res.* 2001 Oct;12(5):515-25.

Nanci A, Zalzal S, Gotoh Y, McKee MD. Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary culture. *Microsc Res Tech.* 1996 Feb;33(2):214-31.

Nebe JG, Luethen F, Lange R, Beck U. Interface interactions of osteoblasts with structured titanium and the correlation between physicochemical characteristics and cell biological parameters. *Macromol Biosci.* 2007 May 10;7(5):567-78.

Nguyen HQ, Deporter DA, Pilliar RM, Valiquette N, Yakubovich R. The effect of sol-gel-formed calcium phosphate coatings on bone ingrowth and osteoconductivity of porous-surfaced Ti alloy implants. *Biomaterials.* 2004 Feb;25(5):865-76.

Okazaki Y. Surface analysis of Ti-15Nb-4Ta alloy after implantation in rat tibia. *Biomaterials.* 2001 Mar;22(6):599.

Oliva MA, Maximiano WM, de Castro LM, da Silva PE Jr, Fernandes RR, Ciancaglini P, et al. Treatment with a growth factor-protein mixture inhibits formation of mineralized nodules in osteogenic cell cultures grown on titanium. *J Histochem Cytochem*. 2009 Mar;57(3):265-76.

Oliveira MV. Desenvolvimento de revestimento poroso de titânio para implantes cirúrgicos [tese]. Rio de Janeiro: Faculdade de Engenharia (RJ): UFRJ; 2003.

Oliveira MV, Pereira LC, Cairo CAA. Porous structure characterization in titanium coating for surgical implants. *Mater Res*. 2002;5(3):269-73.

Oliveira MV, Pereira LC, Cairo CAA. Titanium porous coating for surgical implants processes by powder metallurgy. In: *Anais do International Conference on Adv in Mater and Processing*. Madrid. 2001 v.3. p.1457-62.

Pilliar RM, Deporter DA, Watson PA, Pharoah M, Chipman M, Valiquette S, et al. The effect of partial coating with hydroxyapatite on bone remodeling in relation to porous-coated titanium-alloy dental implants in dog. *J Dent Res*. 1991 Oct;70(10):1338-45.

Pilliar RM, Deporter DA, Watson PA, Todescan R. The endopore implant-enhanced osseointegration with a sintered porous-surfaced design. *Oral Health*. 1998 Jul;88(7):61-4.

Pilliar RM. Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous surface-structured designs. *Implant Dent*. 1998;7(4):305-14.

Pilliar RM. Powder metal-made orthopedic implants with porous surface for fixation by tissue ingrowth. *Clin Orth Rel Res*. 1983 Jun;176:42-51.

Ripamonti U, Ramoshebi LN, Teare J, Renton L, Ferretti C. The induction of endochondral bone formation by transforming growth factor-beta(3): experimental studies in the non-human primate *Papio ursinus*. *J Cell Mol Med*. 2008 Jun;12(3):1029-48.

Roberts WE, Smith RK, Zilberman Y, Mozsary PG, Smith RS. Osseous adaptation to continuous loading of rigid endosseous implants. *Am J Orthod*. 1984 Aug;86(2):95-111.

Rosa AL, Beloti MM. Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. *Braz Dent J*. 2003;14(1):16-21.

Scharnweber D, Beutner R, Rossler S, Worch H. Electrochemical behavior of titanium-based materials – are there relations to biocompatibility? *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Dec;13(12):1215-20.

Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J, et al. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *J Dent Res*. 2003 May;82(5):372-6.

Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontology* 2000. 1998 Jun;17:22-35.

Sepulveda P, Bressiani AH, Bressiani JC. In vivo evaluation of hydroxyapatite foams. *J Biomed Mater Res*. 2002 Dec 15;62(4):587-92.

Sinha RK, Morris F, Shah SA, Tuan RS. Surface composition of orthopaedic implant metals regulates cell attachment, spreading, and cytoskeletal organization of primary human osteoblasts in vitro. *Clin Orthop Relat Res*. 1994 Aug;(305):258-72.

Steinemann SG. Titanium: the material of choice? *Periodontol* 2000. 1998 Jun;17:7-21.

Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Suzuki J, Kokubo T, Nakamura T. Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. *Biomaterials*. 2005 Oct;26(30):6014-23.

Thieme M, Wieters KP, Bergner F, Scharnweber D, Worch H, Ndop J, et al. Titanium powder sintering for preparation of a porous functionally graded material destined for orthopedic implants. *J Mater Sci Mater Med*. 2001 Mar;12(3):225-31.

Vasconcellos LMR, Oliveira MV, Graça ML, Vasconcellos LG, Cairo CA, Carvalho YR. Design of dental implants, influence on the osteogenesis and fixation. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Aug;19(8):2851-7.

Vasconcellos LMR, Oliveira MV, Graça ML, Vasconcellos LG, Carvalho YR, Cairo CA. Porous titanium scaffolds produced by powder metallurgy for biomedical applications. *Mater Res*. 2008;11(3):275-80.

Vidigal GM Jr, Aragones LC, Campos A Jr, Groisman M. Histomorphometric analyses of hydroxyapatite-coated and uncoated titanium dental implants in rabbit cortical bone. *Implant Dent*. 1999;8(3):295-302.

Yang YZ, Tian JM, Tian JT, Chen ZQ, Deng XJ, Zhang DH. Preparation of graded porous titanium coatings on titanium implant materials by plasma spraying. *J Biomed Mater Res*. 2000 Nov;52(2):333-7.

Wen CE, Yamada Y, Shimojima K, Chino Y, Asahina T, Mabuchi M. Processing and mechanical properties of autogenous titanium implant materials. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Apr;13(4):397-401.

Zhu X, Chen J, Scheideler L, Altebaeumer T, Geis-Gerstorfer J, Kern D. Cellular reaction of osteoblasts to micron-and submicron-scale porous structures of titanium surfaces. *Cells Tissues Organs*. 2004;178(1):13-22.

Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J, Wieland M, Landolt D, et al. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials*. 2005 May;26(14):1837-47.

APÊNDICE A – Dados originais das análises

Quadro1 - Dados originais do número de células aderidas às amostras de titânio.

ADESÃO CELULAR – 24 h (número de células)		
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
4	2	4
3	4	3
6	5	4

Quadro 2 – Dados originais da análise da proliferação e viabilidade celular obtidos nas amostras de titânio.

AMOSTRA	TEMPO DE ANÁLISE (dias)		
	7	10	14
Grupo 1	0,071	0,095	0,091
	0,070	0,122	0,099
	0,068	0,094	0,12
Grupo 2	0,081	0,123	0,115
	0,099	0,117	0,117
	0,090	0,104	0,104
Grupo 3	0,078	0,104	0,104
	0,104	0,096	0,096
	0,121	0,125	0,125

Quadro 3 – Dados originais da análise do conteúdo de proteína total obtidos nas amostras de titânio.

AMOSTRA	TEMPO DE ANÁLISE (dias)		
	7	10	14
Grupo 1	0,025	0,057	0,037
	0,020	0,066	0,045
	0,048	0,069	0,050
Grupo 2	0,043	0,094	0,099
	0,044	0,097	0,098
	0,051	0,072	0,093
Grupo 3	0,069	0,114	0,114
	0,065	0,094	0,139
	0,052	0,103	0,119

Quadro 4 – Dados originais da análise da atividade da fosfatase alcalina obtidos nas amostras de titânio.

AMOSTRA	TEMPO DE ANÁLISE (dias)		
	7	10	14
Grupo 1	0,043	0,063	0,092
	0,044	0,062	0,094
	0,044	0,069	0,155
Grupo 2	0,044	0,071	0,111
	0,045	0,064	0,125
	0,043	0,055	0,127
Grupo 3	0,045	0,062	0,103
	0,046	0,070	0,108
	0,049	0,057	0,171

Quadro 5 – Dados originais da análise da quantificação dos nódulos de mineralização obtidos nas amostras de titânio.

AMOSTRA	TEMPO DE ANÁLISE (dias)		
	7	10	14
Grupo 1	0,071	0,056	0,078
	0,033	0,055	0,08
	0,037	0,051	0,108
Grupo 2	0,189	0,192	0,249
	0,191	0,194	0,255
	0,194	0,147	0,263
Grupo 3	0,468	0,513	0,400
	0,477	0,514	0,416
	0,482	0,520	0,895

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028
Fax: (12) 3947-9010 / suely@fosjc.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **052/2007-PH/CEP**, sobre **“Avaliação in vitro da adesão, proliferação e diferenciação de células osteoblásticas em implantes de titânio com superfície porosa”**, sob a responsabilidade de **RODRIGO DIAS NASCIMENTO**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 12 de junho de 2007.

Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do CEP/HUMANOS/FOSJC

Nascimento RD. *In vitro* osteogenesis on titanium samples with different porosities [doctorate thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – São Paulo State University; 2009.

ABSTRACT

Changes in physical and chemical properties on the surface of titanium seek to accelerate and improve osseointegration. Furthermore, the creation of porous substrates, provide greater strength in the osseointegrated interface due to the bone ingrowth. The aim of this study was to evaluate the influence of porosity on osteogenesis in vitro in samples of titanium. Were made by the powder metallurgy, discs of pure titanium grade 2 with 12 mm diameter and 3 mm in height, which were divided into three groups: a) G1: control - titanium machined b) G2: 30% porosity and pore with 300 μm c) G3: 40% of porosity and pore size of 300 μm . Initially, the area of 03 specimens of each group was characterized by metallography analysis, to confirm the quantity, area, shape and interconnection of pores. To conduct the study, osteogenic cells derived from calvaria of newborn rats were cultured on the samples of each group and evaluated for adhesion, after 24 hours, proliferation and cell viability after 3, 7 and 10 days. The cell differentiation was assessed by measuring the total protein content, alkaline phosphatase activity and bone-like nodule formation at 7, 10 and 14 days. The results obtained with ANOVA and Tukey tests (5%) indicated that there was cell adhesion on all surfaces and it does not interfere in the results. The porous surfaces (G2 and G3) provide better results in cell proliferation when compared to smooth surfaces. The content of total protein and the formation of bone-like nodules were significantly higher in samples from G3. However, there was no statistical difference in the values of alkaline phosphatase activity between the experimental groups. These results suggest a correlation between the surface topography of the samples and the phenomena of adherence, proliferation and cell differentiation.

Keywords: *Implants. Titanium. Surface roughness. Osteogenesis. Cell culture.*