

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

PATRÍCIA ABDO GRAVINA

**BIOMIMETIZAÇÃO DE DIFERENTES SUPERFÍCIES DE TITÂNIO
COM FIBRONECTINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientação: Prof. Carlos Nelson Elias - D.C.
Prof. Fernando Costa e Silva Filho - D.C.

Rio de Janeiro

2010

C2010

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha.

Rio de Janeiro – RJ CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmar ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do autor e do orientador.

616.314 Gravina, Patrícia Abdo
G777b Biomimetização de diferentes superfícies de titânio com
Fibronectina/Patrícia Abdo Gravina
Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2010.
69 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Instituto Militar de
Engenharia – Rio de Janeiro, 2010.

1. Implantes de titânio.
2. Tratamento de superfícies. 3. Fibronectina.
4. Osseointegração. I. Título. II. Instituto Militar de
Engenharia.

CDD 616.314

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

PATRÍCIA ABDO GRAVINA

**BIOMIMETIZAÇÃO DE DIFERENTES SUPERFÍCIES DE TITÂNIO
COM FIBRONECTINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientadores: Carlos Nelson Elias - D.C.
Fernando Costa e Silva Filho – D.C.

Aprovada em 26 de Abril de 2010 pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Carlos Nelson Elias - D.C. do IME - Presidente

Prof. Fernando Costa e Silva Filho - D.C. da UFRJ

Prof. Luis Henrique Leme Louro – Ph.D. do IME

Prof. Vinícius Bemfica Barreira Pinto - D.C. da UFRJ

Rio de Janeiro

2010

Aos meus pais Marco e Marise.

Ao meu irmão Marco.

Às amigas alminhas.

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos em todas os momentos;

Aos meus queridos orientadores Carlos Nelson Elias e Fernando Costa e Silva Filho;

À minha amada família;

À tia Cátia Cardoso Abdo Quintão;

Às grandes amigas de curso, que ajudaram a superar momentos difíceis ao longo desta caminhada;

A todos os colegas do curso;

Ao Joel Fonseca dos Santos;

Ao Hector Borja;

A todos os professores do Instituto Militar de Engenharia;

A todos os alunos, funcionários e técnicos do Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Biofísica da UFRJ, que de alguma forma auxiliaram para que meu trabalho viesse a ser concluído;

Ao Gustavo Miranda Rocha, do Laboratório de Física Biológica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que auxiliou na caracterização das amostras por microscopia de força atômica.

Agradeço pela ajuda prestada, força, incentivo e amizade para que eu obtivesse êxito em mais esta etapa da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	8
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE GRÁFICOS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVO.....	17
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1 Biomateriais.....	18
3.2 Biocompatibilidade do Titânio.....	18
3.3 Tratamentos de Superfícies do Titânio.....	19
3.4 Interação de Células com a Superfície de Titânio.....	27
3.4.1 Adsorção, Fixação e Adesão Celulares.....	27
3.4.2 Formação Óssea.....	28
3.4.3 Osteogênese à Distância e Osteogênese de Contato.....	29
3.4.4 Cascata de Eventos Biológicos Durante a Instalação do Implante Osseointegrável.....	30
3.4.5 Influência das Superfícies de Titânio na Interação Celular.....	32
3.5 Fibronectina.....	33
3.5.1 Interação Fibronectina-Integrina.....	36
3.5.2 Interação Fibronectina-Osteoblasto.....	39
3.5.3 Incorporação de Fibronectina às Superfícies de Titânio.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 Amostras de Titânio.....	43
4.2 Caracterização das Superfícies de Titânio Porous® e Nano.....	43
4.2.1 Morfologia Ultraestrutural.....	43
4.2.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução.....	43

4.2.1.2	Microscopia de Força Atômica.....	44
4.2.2	Identificação das Fases Cristalinas.....	44
4.3	Incorporação de Fibronectina.....	45
4.4	Cultivo de Osteoblastos.....	46
4.5	Interação de Células com as Superfícies de Titânio.....	46
4.6	Radioatividade Associada às Superfícies de Titânio.....	47
5	RESULTADOS.....	48
5.1	Caracterização das Superfícies de Titânio Porous® e Nano.....	48
5.1.1	Morfologia Ultraestrutural.....	48
5.1.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução.....	48
5.1.1.2	Microscopia de Força Atômica.....	49
5.1.2	Identificação das Fases Cristalinas.....	52
5.2	Incorporação de Fibronectina.....	53
5.3	Interação de Células com as Superfícies de Titânio.....	53
5.4	Radioatividade Associada às Superfícies de Titânio.....	54
6	DISCUSSÃO.....	57
6.1	Caracterização das Superfícies de Titânio Porous® e Nano.....	57
6.2	Incorporação de Fibronectina.....	58
6.3	Interação de Células com as Superfícies de Titânio.....	58
6.4	Radioatividade Associada às Superfícies de Titânio.....	59
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	62
8	CONCLUSÕES.....	63
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 3.1	Representação esquemática da interação - célula - superfície de um biomaterial (GIL, 2009).....	28
FIG. 3.2	Representação esquemática da osteogênese à distância e da osteogênese de contato (modificada de DAVIES, 2003).....	30
FIG. 3.3	Esquema da retenção da rede de fibrina pela superfície lisa e rugosa do implante (modificada de DAVIES, 2003).....	32
FIG. 3.4	Representação esquemática da fibronectina e alguns de seus sítios de ligação (modificada de DAVIES, 2003).....	34
FIG. 3.5	Representação de cinco repetições consecutivas de módulos de fibronectina do Tipo III e o mecanismo de elasticidade molecular. A: conformação estendida, não tensionada, disposta em “zigzag”. B: três estágios de elasticidade molecular. B ₁ : molécula relaxada em “zigzag”; B ₂ : alinhamento dos domínios sob baixa tensão; e B ₃ e B ₄ : desdobramento completo do módulo central sob alta tensão (ERICKSON, 1994).....	35
FIG. 3.6	Modelo de fibrilogênese. (a): dímero de fibronectina secretado em uma forma compacta; (b): dímeros de fibronectina se ligam a integrinas nas superfícies das células; (c): células exercem força sobre as moléculas de fibronectina, expondo sítios críticos; (d): formação de estruturas que aglomeram integrinas ligadas às moléculas de fibronectina, promovendo a formação de densas matrizes fibrilares que regulam o fenótipo celular (modificada de SCHWARZBAUER, 1999).....	37
FIG. 3.7	Ilustração esquemática de alguns componentes de um contato focal. As integrinas interligam a MEC ao citoesqueleto de actina através de proteínas de ancoragem como a talina e a vinculina. Outras proteínas se associam à estrutura, mas têm funções de sinalização celular, como, por exemplo, as quinases de adesão focal (FAK) e as Src (modificada de MENEZES, 2003).....	39
FIG. 4.1	Espectrofotômetro Spectrum 22PC.....	45
FIG. 5.1	Morfologia da superfície da amostra Poraus®.....	48
FIG. 5.2	Morfologia da superfície da amostra Nano.....	49

FIG. 5.3 Morfologia da superfície da amostra Porous® em MFA.....	50
FIG. 5.4 Morfologia da superfície da amostra Nano em MFA.....	51
FIG. 5.5 Espectro de difração de raios X da superfície Porous®.....	52
FIG. 5.6 Espectro de difração de raios X da superfície Nano.....	52

LISTA DE TABELAS

TAB. 5.1	Associação (adsorção + adesão) de células às superfícies Porous®, Porous® com FN, Nano e Nano com FN.....	54
TAB. 5.2	Radioatividade associada às superfícies Porous®, Porous® com FN, Nano e Nano com FN, num intervalo de tempo de três horas.....	55

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁF. 5.1 Radioatividade associada às superfícies Porous®, Porous® com FN, Nano e Nano com FN.....	56
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AES	-	Espectroscopia de elétrons Auger
ASTM	-	American Society for Testing and Materials
Com	-	Contagens por minuto
DRX	-	Difração de raios X
DMEM	-	Meio modificado de Dulbecco
EDTA	-	Ácido etilenodiaminotetraacético
HÁ	-	Hidroxiapatita
FGF	-	Fator de crescimento de fibroblastos
FN	-	Fibronectina plasmática humana
HOB	-	Células osteoblásticas humanas
MEC	-	Matriz Extracelular
MEV	-	Microscopia eletrônica de varredura
MEV-AR	-	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução
MFA	-	Microscopia de força atômica
PBS	-	Solução salina (0,15M) tamponada com fosfato (0,01M)
PDGF	-	Fator de crescimento derivado de plaquetas
R _a	-	Média aritmética da altura dos picos (rugosidade média)
SBF	-	Soro fetal bovino
SPH	-	<i>Spray</i> de plasma de hidroxiapatita
SPT	-	<i>Spray</i> de plasma de titânio
TGF- β	-	Fator de crescimento/transformação-beta
Ti cp	-	Titânio comercialmente puro
VN	-	Vitronectina
XPS	-	Espectroscopia fotoeletrônica de raios X

RESUMO

Os diversos tratamentos de superfícies de implantes dentários de titânio desenvolvidos na última década têm como objetivo otimizar a cicatrização óssea, promover maior taxa de osseointegração e aumentar a resistência da interface osso-implante. No presente trabalho, duas diferentes superfícies de titânio foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução, microscopia de força atômica e difração de raios X, e em seguida submetidas à incorporação de fibronectina plasmática humana. O estudo se propôs a investigar se a biofuncionalização dessas superfícies poderia influenciar na interação com as células. A adsorção, a adesão e a proliferação foram avaliadas por contagem de células em câmara hematimétrica de Neubauer e contagem por cintilação líquida. As técnicas de caracterização utilizadas demonstraram que as superfícies avaliadas (Porous® - tratamento com ácidos – e Nano – tratamento com ácidos seguido de imersão em solução contendo fluoretos) possuem características ultraestruturais semelhantes. A espectrofotometria também revelou semelhança na adsorção da fibronectina às duas superfícies (80%). Os índices de associação de células osteoblásticas às amostras Porous®, Porous® com FN, Nano e Nano com FN, e os valores da radioatividade associada às mesmas amostras, expressos em cpm, sugerem que a incorporação de fibronectina é determinante na citocompatibilidade *in vitro* das superfícies. Considerando o interesse em otimizar e acelerar o processo de osseointegração, o recobrimento de superfícies de titânio com fibronectina mostrou ser uma ótima opção de tratamento para os implantes osseointegráveis utilizados na Odontologia.

ABSTRACT

Several mechanical and chemical treatments of titanium surfaces have been developed during last decade to improve bone healing, promote a higher rate of osseointegration and increase the resistance of bone-implant interface. In this study, two different titanium surfaces were characterized by high-resolution scanning electron microscopy, atomic force microscopy and X-ray diffraction, and then submitted to human plasma fibronectin incorporation. The aim of the present study was to investigate whether the bio-funcionalization of these surfaces could influence the interaction of cells. The adsorption, adhesion and proliferation were evaluated by counting in "Neubauer chamber" and liquid scintillation counting. The techniques used have shown that surfaces analyzed (Porous® - acid etched - and Nano – acid etched followed by immersion in a fluoride containing solution) have similar ultrastructural features. The spectrophotometry also revealed similarity in the adsorption of fibronectin in both surfaces (80%). The association rates of osteoblastic cells to the samples Porous®, Porous® with FN, Nano and Nano with FN, and the values of radioactivity associated with the samples, measured as cpm, suggest that the incorporation of fibronectin is determinant in *in vitro* cytocompatibility of the surfaces. Considering the interest in optimizing and accelerating the process of osseointegration, the coating of titanium surfaces with fibronectin appears to be an option for treatment of implants used in Dentistry.

1 INTRODUÇÃO

O fenômeno da osseointegração de implantes endósseos, conceituado por Branemark em 1969 como sendo a “ligação direta, estrutural e funcional entre o osso vivo e ordenado e a superfície de um implante submetido a cargas funcionais” (BRANEMARK, 1985), é fundamental para o sucesso nas aplicações odontológicas. O titânio comercialmente puro é o principal material empregado para esta aplicação, pois apresenta biocompatibilidade e boa resistência mecânica. Este metal, ao ser exposto aos meios oxidantes, forma espontaneamente em cerca de um milissegundo uma camada de óxido de 10 a 100 Å de espessura. Esta camada se mantém estável na maioria dos meios, principalmente em condições fisiológicas, e cirurgicamente, não apresenta alteração da espessura nem corrosão. Isto garante a interação implante-tecido ósseo e o fenômeno de osseointegração (LIMA, 2003).

As reações do hospedeiro ao biomaterial são determinadas fundamentalmente pelas propriedades de sua superfície. Atualmente, um biomaterial não é mais considerado apenas um substituto anatômico, mas também uma plataforma para diferenciação celular e subsequente neoformação de tecidos. Dessa forma, sua superfície deve ser tratada de tal maneira que induza as células indiferenciadas a se diferenciarem no tecido desejado e induza as células já diferenciadas a terem adequada resposta fisiológica (GIL, 2009). Os diversos tratamentos de superfície dos implantes existentes promovem alterações nas propriedades tribológicas, mecânicas, ultraestruturais, físicas e químicas, como molhabilidade, energia superficial, composição e densidade de grupos químicos ou moléculas (LIMA, 2003; SCHEIDLER, 2007).

Os implantes de titânio utilizados na Odontologia para tratamento do edentulismo total ou parcial sofrem diversas modificações de superfície durante o processo de fabricação para melhorar e acelerar a cicatrização óssea. As pesquisas têm evidenciado uma aceleração no processo de osseointegração e aumento da resistência da interface osso-implante em fixações de superfícies mais rugosas quando comparadas às superfícies relativamente lisas (CHO, 2003; WENNERBERG, 2003). A estabilidade primária, o processo de biofixação e a cinética de neoformação óssea podem ser modificados pela forma, existência ou

não de revestimento superficial, qualidade e morfologia da superfície dos implantes. Mudanças na topografia e/ou na composição química têm demonstrado um aumento da bioatividade dos implantes. Vários trabalhos foram realizados com o intuito de desenvolver superfícies bioativas, favorecendo os mecanismos de interação entre as células e os substratos (KU, 2005; PARK, 2006; SCHEIDELER, 2007; KOKUBUN, 2008; PETRIE, 2008; SANTOS, 2009).

Espera-se que as superfícies com microtopografias complexas promovam osteocondução por proporcionar uma maior área de superfície para adesão das fibrinas, e também por apresentar características de superfície que favoreçam tal adesão. Essas superfícies também potencializam a ativação plaquetária, a qual produz altos gradientes de citocinas e fatores de crescimento através dos quais leucócitos e células osteogênicas irão penetrar no sítio de cicatrização (DAVIES, 2003).

As superfícies de titânio recobertas com biomoléculas podem influenciar nas reações do hospedeiro e conseqüentemente intensificar a integração tecidual (SCHEIDELER, 2007). A fibronectina, uma das principais proteínas de adesão da membrana extracelular, tem sido utilizada nas pesquisas de recobrimento de superfícies, especialmente de titânio. Visto que sua importância na adesão, migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência celulares através de contatos focais com os receptores transmembrana (integrinas) já é bem conhecida, sua incorporação a superfícies de implantes dentários parece ser promissora.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a modificação da superfície de amostras de titânio comercialmente puro mediante o tratamento com flúor e, analisar a influência da adesão e da proliferação de células nas superfícies com e sem recobrimento de fibronectina.

Objetivos específicos:

a) caracterizar a superfície de amostras de titânio submetidas ao ataque ácido seguido do tratamento em solução contendo fluoretos por técnicas de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-AR), microscopia de força atômica (MFA) e difração de raios X (DRX);

b) realizar a deposição de fibronectina (FN) em amostras com e sem tratamento em solução contendo fluoretos e avaliar a absorvância da proteína em ambas as superfícies por espectrofotometria;

c) avaliar a associação de células osteoblásticas humanas (HOB) às amostras, recobertas ou não com FN, por contagem em câmara hematimétrica de Neubauer;

d) avaliar a adesão e a proliferação de osteoblastos humanos quando levados a interagir com as superfícies, com e sem FN, através de contagem por cintilação líquida.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 BIOMATERIAIS

Um biomaterial é qualquer material, natural ou sintético, que possa ser usado completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo (HELMUS, 1995). Eles podem ser classificados quanto ao tipo do material constituinte (polímeros, metais, cerâmicos e macromoléculas naturais), quanto a sua bioatividade e quanto a sua biocompatibilidade. Sabendo-se que a biocompatibilidade é uma propriedade fundamental para o uso de um biomaterial em humanos, torna-se essencial a realização de pesquisas *in vitro* e *in vivo* enfocando o comportamento celular perante o biomaterial (MENDONÇA, 2008).

Na Odontologia, especificamente na Implantodontia, os biomateriais são utilizados na substituição de elementos dentários perdidos. Nestas aplicações emprega-se o titânio na forma de implantes osseointegráveis para substituir as raízes dos dentes. Além do titânio, empregam-se as ligas de titânio e as cerâmicas na confecção das infraestruturas das próteses sobre os implantes.

3.2 BIOCAMPATIBILIDADE DO TITÂNIO

O alto índice de sucesso dos implantes tem sido associado ao emprego do titânio comercialmente puro (Ti cp), o qual apresenta excelente biocompatibilidade. As propriedades dos óxidos de titânio que se formam na superfície são responsáveis pela biocompatibilidade do metal. Dentre as características relevantes do óxido, destacam-se alta resistência à corrosão, estabilidade termodinâmica, estabilidade química e estrutural no meio biológico, repassivação em meio oxidante, baixa solubilidade dos produtos hidratados do óxido, hidróxidos e oxihidróxidos, total ausência de toxicidade dos produtos de corrosão liberados no meio, ponto isoelétrico entre 5 e 6 (superfície levemente negativa no pH fisiológico), permitir a formação de fosfato de cálcio semelhante à apatita sobre a superfície, baixo módulo de elasticidade e constante dielétrica semelhante a da água, o que reduz efeitos

polarizantes entre espécies carregadas na superfície (MAY, 2007). Dentre os vários óxidos de titânio que se formam na superfície em meio oxidante, o TiO_2 é o mais importante para a osseointegração, e pode apresentar três estruturas cristalinas: anatase, rutilo e broquita. Nos implantes sem tratamento de superfície, a presença predominante é do rutilo, responsável pela biocompatibilidade da fixação. Durante os tratamentos de superfície, é possível controlar o tipo de óxido formado, sua rugosidade e composição química. Após os tratamentos, geralmente há formação dos óxidos de titânio rutilo e anatase, e o êxito desses implantes tratados mostra que a presença dos dois tipos de óxidos não compromete a osseointegração (MAY, 2007).

3.3 TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIES DO TITÂNIO

Na última década, foram realizados trabalhos com o objetivo de alterar as propriedades físico-químicas das superfícies do titânio e suas ligas no intuito de aumentar a bioatividade dos implantes (SUL, 2004; PINTO, 2006). O aumento da bioatividade da superfície acelera as reações com o meio biológico, reduz o tempo de cicatrização, acelera o processo de osseointegração e forma uma interface mais resistente através da obtenção de maior área de contato osso-implante e uma possível união química da superfície com o tecido ósseo. Nesse contexto, seria possível a instalação e carregamento precoce das próteses sobre os implantes (SUL, 2004).

Vários processos de modificação das superfícies têm sido desenvolvidos, ou por modificação da topografia ou por alteração na composição química ou por ambos. Segundo WENNERBERG (2003), a mudança adequada na rugosidade superficial pode apresentar melhores resultados em relação à força de ancoragem e travamento mecânico nos estágios iniciais da osseointegração. Além disso, superfícies com microtopografias diferenciadas proporcionam uma maior área de adesão de fibrinas, potencializam a ativação plaquetária e afetam favoravelmente a angiogênese local e as funções celulares como migração, alinhamento, orientação, fixação e diferenciação (CHO, 2003; DAVIES, 2003). Já a modificação química da superfície pode ocasionar alterações no tipo de biomolécula presente, na cinética de atração, na energia da superfície e nas fases dos processos celulares dos

osteoblastos como adesão e sinalização. Os processos de modificação da superfície de titânio através de oxidação anódica e de imersão em ácidos são capazes de produzir alterações químicas e topográficas na estrutura do óxido (PINTO, 2006).

CARVALHO (2009) realizou uma revisão sobre as diferentes superfícies de implantes citadas na literatura e discutiu os efeitos na qualidade da osseointegração, na biomecânica da distribuição de forças e no sucesso a longo prazo. Segundo o autor, a capacidade do implante de suportar cargas é dependente da qualidade da interface osso-implante. Modificações na forma do corpo do implante e na sua superfície aumentam o sucesso pela promoção de maior área de contato ósseo. O estudo classificou os implantes quanto a sua composição (titânio, zircônia, dentre outros materiais) e quanto a sua superfície (usinada, macrotextrizada, microtexturizada, nanotextrizada e biomimética). As superfícies macrotextrizadas podem ser produzidas por processo de adição (*spray* de plasma de titânio - SPT – ou de hidroxiapatita – SPH) ou deformação (jateamento com partículas de vários diâmetros). As superfícies microtexturizadas são obtidas pelo ataque ácido. O tratamento ácido também pode ser realizado após o jateamento, como é o caso da superfície SLA® (*sand blasted large grit and acid etched surface*), lançada no mercado pelo *Institut Strauman*, Waldenburg, Suíça (1994). Este tipo de tratamento combina a macro com a microtextura. Já as superfícies nanotextrizadas são obtidas através do aumento controlado da camada de óxido, incluindo alterações na espessura, rugosidade e textura do óxido. O método de obtenção é eletroquímico, chamado oxidação anódica. As superfícies biomiméticas são produzidas pela deposição de fosfato de cálcio sob condições fisiológicas de temperatura e pH. Uma vez ligadas à estrutura do material, as biomoléculas são liberadas gradualmente, além de terem capacidade de formar uma matriz com propriedades osteoindutora e osteocondutora (CARVALHO, 2009).

Considerando que a interação das células e dos tecidos com o implante é afetada pela topografia em níveis macroscópicos e pela rugosidade em níveis microscópicos, espera-se que o aumento da área superficial do implante aumente o número de sítios de ligação para as células, facilitando o crescimento dos tecidos e aumentando a estabilidade mecânica. Entretanto, o nível de rugosidade deve ser controlado, pois as células necessitam de pontos de ancoragem na superfície do implante para iniciar a proliferação e garantir a biofixação. Se a superfície possuir

rugosidade muito menor que o tamanho das células, poderá ocorrer ausência dos sítios de ligação. Por outro lado, se o implante possuir picos e vales com superfícies lisas, as células também não poderão se fixar (ELIAS, 2000; ELIAS, 2001).

Não existe consenso na literatura com relação à influência das características tribológicas dos implantes na biofixação, principalmente na definição da melhor rugosidade e energia superficial (ELIAS, 2001; PINTO, 2006). As pesquisas atuais estão voltadas para investigar a reação das células às diferentes mudanças ultraestruturais de uma superfície, ou seja, suas características micro e nanométricas. Do ponto de vista de topografia, todo tratamento de superfície que promova alterações micrométricas causará inevitavelmente alterações nanométricas (PINTO, 2006).

Existem vários parâmetros para medir a rugosidade de uma superfície. Dentre eles, o parâmetro R_a (média aritmética da altura dos picos) é o mais conhecido e o mais utilizado. A determinação desses parâmetros é muito influenciada pelo tipo de aparelho e pelo filtro imposto ao sinal obtido. Portanto, não podem ser excludentes e sim complementares entre si, já que a descrição da topografia de uma superfície é muito complexa para ser resumida por um ou dois parâmetros de rugosidade (PINTO, 2006).

Superfícies que possuem estruturas iguais em todas as direções com respeito a tamanhos e desvios espaciais são denominadas isotrópicas. Jateamentos abrasivos, espargimentos de plasma, ataques químicos e oxidação anódica são tratamentos que possibilitam a formação dessas superfícies. Já processos de fabricação de superfícies como a usinagem produzem irregularidades com orientações diferentes e preferenciais, sendo denominadas superfícies anisotrópicas (HOSTNER, 2001). Com as superfícies isotrópicas é possível obter melhores reações ósseas e uma osseointegração mais resistente (HOSTNER, 2001; ELIAS, 2005; PINTO, 2006). Implantes jateados e tratados com ácido, por exemplo, possuem superfícies com rugosidade homogênea e porosidades que permitem melhor adesão das células do que os implantes com superfícies sem tratamento (ELIAS, 2005).

Vários trabalhos têm sido realizados no intuito de comparar diferentes tratamentos de superfícies. As análises biomecânicas (resistência à remoção dos implantes por torque ou por tração) e histomorfométricas (percentual de contato osso-implante) são as mais comumente realizadas (WONG, 1995; CORDIOLI, 2000;

MARIN, 2008). No estudo de WONG (1995), implantes com superfícies jateadas, atacadas por ácido e revestidas com hidroxiapatita foram instalados em tíbias de cobaias e após doze meses, as superfícies foram comparadas para obter uma correlação entre a rugosidade e a resistência à força de remoção por tração, além de avaliar o percentual de contato osso-implante obtido em cada superfície. Os resultados demonstraram uma correlação positiva entre a rugosidade e a força de remoção, além de demonstrarem superioridade da superfície de hidroxiapatita em termos de contato ósseo e resistência à força de cisalhamento para remoção. No trabalho de CORDIOLI (2000), também foram feitas análises histomorfométricas e biomecânicas da resposta óssea a quatro tipos de topografias superficiais de implantes dentários: usinado, jateado, plasma *spray* de titânio (TPS®) e ataque ácido. O valor de torque reverso foi maior no grupo tratado com ataque ácido, e menor no usinado. Já no estudo experimental de MARIN (2008), duas superfícies foram caracterizadas por MEV, MFA e AES (espectroscopia de elétrons Auger). Os implantes foram instalados em tíbias de cães. O jateamento seguido de ataque ácido (BGB/AA – teste) e duplo ataque ácido (controle) foram os tipos de tratamento de superfícies avaliados. Duas a quatro semanas após a cirurgia, os animais foram sacrificados e as superfícies comparadas quanto ao torque de remoção e porcentagem de contato com o osso. Um maior grau de organização do tecido ósseo foi observado ao longo do implante teste, apesar da diferença de contato osso-implante não ter sido significativa ($P > 0,25$). Com relação ao torque de remoção, os valores foram significativamente maiores no implante teste em ambos os períodos ($P < 0,0001$). O autor concluiu que a superfície jateada e submetida ao ataque ácido (teste) apresenta uma fixação biomecânica precoce, e que a porcentagem de contato osso-implante não deve ser considerada um parâmetro para comparar superfícies.

AMARANTE (2001) realizou uma revisão de literatura, por meio de uma seleção de 36 artigos, visando analisar os resultados publicados sobre as seguintes superfícies de implantes: tratadas com plasma *spray* de titânio (TPS®) e jateadas e tratadas com ácido (SLA®). Os estudos da topografia da superfície no comportamento celular mostraram que a porosidade não é uma condição necessária para que ocorra aposição óssea, entretanto desempenha um papel preponderante no percentual de aposição óssea sobre a superfície do implante, assim como na

velocidade com que essa ocorre. Neste contexto, a superfície SLA® se destacou por apresentar melhorias nesses parâmetros. Os resultados mostraram que a rugosidade e o tratamento químico das superfícies elevam as forças cisalhantes de remoção dos implantes por torção. O autor concluiu que as alterações nas superfícies dos implantes de titânio, além de otimizarem a osseointegração, podem ainda permitir o carregamento precoce dos mesmos e sua utilização em áreas de menor densidade óssea ou em osso regenerado. BUSER (1998) comparou duas superfícies de implantes dentários em um experimento com cobaias. Uma superfície com duplo ataque ácido (Osseotite®) e uma superfície jateada e atacada com ácido (SLA®) foram testadas quanto à resistência ao torque de remoção para avaliação da força de cisalhamento da interface osso-implante. O torque médio para remoção do implante SLA® foi muito maior que para a remoção do implante Osseotite® após um período de cicatrização de três meses. CAMARGO (2002) realizou um estudo em humanos para avaliar o sucesso clínico e radiográfico e os efeitos dos implantes SLA® instalados em mandíbula e maxila perante os tecidos periimplantares. Os implantes foram carregados proteticamente após seis semanas de instalação e avaliados periodicamente (três semanas, três, seis e doze meses) através de radiografias (análise de perda óssea), do *Periotest* (avaliação da evolução da mobilidade) e de exames clínicos dos tecidos periimplantares. Após os doze meses de acompanhamento, nenhum dos implantes instalados apresentou perda óssea progressiva, aumento da mobilidade ou inflamação periimplantar.

De acordo com BUSER (1991), JANSEN (1998), MISCH (1999) e UEHARA (2004), a superfície com deposição por plasma *spray* de hidroxiapatita (HA) obteve os maiores percentuais de contato osso-implante nas análises histológicas em comparação com outras superfícies. Por outro lado, a adesão de HA (denominado revestimento bioativo de primeira geração) ao substrato metálico é fraca, pois ocorre apenas travamento mecânico entre a cobertura cerâmica e o óxido de titânio, possibilitando a ocorrência de delaminação de partículas da superfície quando o dispositivo é submetido a cargas mecânicas durante a mastigação (ROHRER, 1999). O processo de deposição de apatita usado nos implantes pela técnica de plasma *spray* (o revestimento é aquecido à elevada temperatura durante o processo e resfriado instantaneamente) altera as propriedades químicas e cristalográficas da hidroxiapatita original, acentuando a fragilidade e aumentando a dissolução do

revestimento depositado (SYKARAS, 2000). Dessa forma, as alterações físico-químicas ocorridas na hidroxiapatita depositada podem levar à perda precoce dos implantes instalados (BIESBROCK, 1995). Segundo CARVALHO (2009), falhas como o descolamento da hidroxiapatita, exposição das roscas do implante no meio bucal e conseqüente infecção (periimplantite) e perda óssea marginal foram responsáveis pelo declínio do uso desse tipo de tratamento de superfície de implantes dentários.

Outras tentativas de aumentar a bioatividade dos implantes de titânio foram feitas mediante o tratamento em que íons e biomoléculas são introduzidos ou reagem com a camada superficial do óxido, formando compostos que aumentam a capacidade de interação da superfície com o meio biológico (PINTO, 2006). Esse tratamento de superfície, denominado oxidação anódica, tem sido muito utilizado pela simplicidade da técnica, baixo custo e pela possibilidade de alterar várias propriedades de superfície simultaneamente. O processo resulta em aumento da espessura da camada protetora de óxido superficial e é capaz de produzir mudanças significativas nas propriedades microestruturais e na cristalinidade do óxido, alternando a predominância de anatase ou rutilo de acordo com a voltagem de anodização e a conseqüente espessura do óxido (SUL, 2002; PINTO, 2006).

A técnica de oxidação anódica dos implantes de titânio, além de modificar as propriedades do óxido tais como cristalinidade, porosidade, espessura e rugosidade, pode também alterar a composição química da superfície pela incorporação de íons advindos da solução de eletrólitos na qual os implantes sofreram o processo de oxidação (PINTO, 2006). A maioria dos trabalhos de oxidação anódica utiliza íons cálcio, fosfato, sulfato, e atualmente magnésio e flúor (SUL, 2001; SUL, 2002; SUL, 2003; SUL, 2005; SUL, 2006 e PINTO, 2006).

No trabalho realizado em 2003, SUL comparou a resposta óssea e o torque de remoção de implantes submetidos à oxidação anódica contendo íons cálcio, fosfato e sulfato. As superfícies incorporadas com cálcio revelaram resultados mais elevados nos ensaios de torque e na resposta do tecido ósseo, qualitativa e quantitativamente, demonstrando possibilidade real de união bioquímica entre o osso e a superfície de titânio. Em 2005, o mesmo autor realizou outro trabalho *in vivo* comparando duas superfícies tratadas por oxidação anódica: a primeira contendo íon magnésio, incorporado pelo processo de oxidação, e a segunda

contendo apenas óxido de titânio. Os resultados demonstraram que a superfície com magnésio é capaz de desenvolver uma forte integração com o tecido ósseo, constatada pelos ensaios de torque de remoção e pela análise do local das fraturas ocorridas durante os ensaios de remoção. Já em 2006, SUL utilizou coelhos para comparar o torque de remoção de implantes com superfícies modificadas pela incorporação de magnésio, submetidas à anodização (TiUnite®) e duplo ataque ácido (Osseotite®). Os resultados mostraram que com três semanas, a superfície com incorporação de magnésio apresentou o maior torque de remoção e o maior grau de contato osso-implante, embora com seis semanas essas diferenças não tenham sido significativas quanto ao torque de remoção. Os autores sugerem que a superfície com magnésio apresenta uma rápida osseointegração, apesar da baixa rugosidade, quando comparada à superfície mais rugosa do TiUnite®.

Em um estudo realizado por JOHANSSON (2003), superfícies tratadas com fluoretos se revelaram mais lisas que as superfícies jateadas, mas as primeiras mostraram outras características importantes para a osseointegração, como maior capacidade de ligação cálcio-fósforo à superfície, o que poderia indicar um aumento da capacidade da superfície reagir com os tecidos calcificados e criar uma integração entre o osso e o implante. Segundo ELLINGSEN (2003), tratamentos com fluoretos têm demonstrado maior capacidade de nucleação de cristais de fosfato *in vitro* e maior resistência de osseointegração *in vivo* testada por torque de remoção. PINTO (2005) apresentou resultados preliminares de um processo desenvolvido com objetivo de modificar superfícies de implantes de titânio utilizando fluoretos, incorporados no filme de óxido de titânio formado durante a anodização. Alterações na microtopografia e na composição química foram demonstradas. Em 2006, PINTO realizou alterações nas superfícies de titânio através de soluções contendo cálcio, sódio, fósforo e flúor, empregando-se a oxidação anódica e a imersão química. Seus resultados mostraram que o tratamento químico das superfícies reduziu a rugosidade, mas proporcionou melhores resultados *in vivo* das superfícies tratadas (teste) quando comparadas às superfícies comerciais Porous Plus® (Conexão Sistemas de Próteses) utilizadas como controle.

BERGLUNDH (2007) realizou um estudo comparativo *in vivo* entre uma superfície de implante jateada com partículas de óxido de titânio (Microthread® – controle) e uma superfície jateada com partículas de óxido de titânio e modificada

com flúor (Osseospeed® - teste). Foram realizadas análises histomorfométricas duas semanas após as implantações para avaliar a formação de osso no espaço entre as roscas dos implantes e o leito ósseo cirúrgico e o contato osso-implante. Os resultados revelaram maior formação óssea e maior porcentagem de contato osso-implante nos implantes modificados com flúor num período inicial de integração. ABRAHAMSSON (2008) utilizou as mesmas superfícies do trabalho anterior (Microthread® e Osseospeed®) para comparar *in vivo* os efeitos dessas superfícies em defeitos periimplantares marginais. Foram criados defeitos marginais com o auxílio de brocas em 50% dos alvéolos cirúrgicos realizados para receberem os implantes. Seis semanas após a instalação dos implantes, os cachorros utilizados no experimento foram sacrificados e análises histomorfométricas foram realizadas, revelando maior área de osseointegração e maior grau de contato osso-implante nos defeitos marginais do grupo teste (Osseospeed®). O autor sugeriu que as superfícies de implantes contendo flúor otimizam a formação óssea e a osseointegração. MONJO (2008), através de um estudo *in vivo* com marcadores de expressão osteogênica, concluiu que os implantes modificados com flúor modulam eventos inflamatórios e de reabsorção e neoformação ósseas na interface osso-implante, sugerindo que esses efeitos biológicos fazem parte do desempenho clínico dessas superfícies.

BARROS (2009) realizou um estudo comparativo em cães para investigar se a biofuncionalização (recobrimento biológico) de superfícies de implantes poderia influenciar na deposição óssea ao redor dos mesmos. Quatro superfícies, dentre elas duas bioativas (com baixa e alta concentração de peptídeos), uma somente microtexturizada e a última microtexturizada e contendo apenas o veículo de adsorção do peptídeo (hidroxiapatita), foram analisadas histomorfometricamente após o período de osseointegração de oito semanas. A autora concluiu que a superfície que apresentou maior densidade óssea adjacente foi a microtexturizada modificada pela adição de baixa concentração peptídica (bioativa), mas os resultados apresentados não foram estatisticamente significantes.

Superfícies de implantes recobertas com biomoléculas podem influenciar nas reações básicas do hospedeiro e subsequentemente intensificar a integração tecidual (SCHEIDELER, 2007). Atualmente, diversos trabalhos utilizando técnicas de imobilização de fatores biológicos, especialmente a fibronectina, na superfície dos

implantes têm sido desenvolvidas para otimizar a osseointegração (KU, 2005; PARK, 2006; SCHEIDELER, 2007 e PETRIE, 2008).

3.4 INTERAÇÃO DE CÉLULAS COM A SUPERFÍCIE DE TITÂNIO

3.4.1 ADSORÇÃO, FIXAÇÃO E ADESÃO CELULARES

A adsorção celular é o processo pelo qual células interagem intimamente com os substratos biológicos ou não, única e exclusivamente pela ação de forças interfaciais, eletrostáticas e brownianas (VAN OSS, 1990). O passo inicial do processo de adesão é a fixação celular, ou seja, a formação de interações específicas receptor-ligante. A adesão celular clássica só ocorre quando há o disparo de pelo menos uma cascata de sinalização que terá como objetivo algum tipo de regulação gênica e, eventualmente, modificação fenotípica por parte da célula em questão (MENEZES, 2003).

KASEMO (2002) relata a importância do reconhecimento das diversas superfícies pelas células. A partir do momento em que ocorre a identificação do biomaterial pela célula, a mesma tem sua morfologia alterada. Este espalhamento celular faz parte do processo de maturação da própria célula, e é responsável por sua adesão à superfície do implante através dos receptores transmembrana (integrinas).

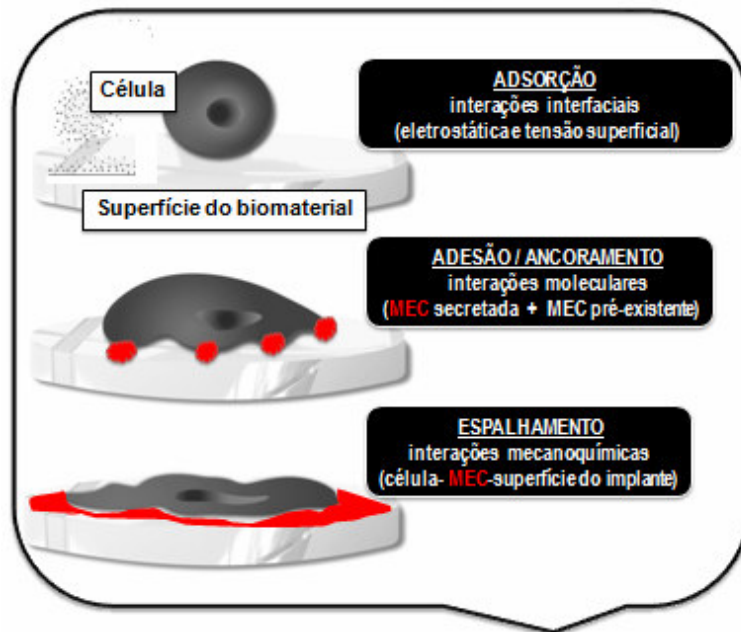


FIG. 3.1: Representação esquemática da interação - célula - superfície de um biomaterial (GIL, 2009)

Em condições eletrostáticas e de tensão superficial favoráveis, uma célula adsorve-se à superfície do biomaterial. Nesta, que se encontra revestida com proteínas da Matriz Extracelular (MEC), a célula ancora-se e passa a responder à interface MEC/ biomaterial secretando sua própria MEC. Sobre a malha molecular resultante (MEC inicial + MEC recém secretada) a célula se espalha (FIG. 3.1) (GIL, 2009).

3.4.2 FORMAÇÃO ÓSSEA

O organismo contém células que estão programadas para converter-se em células formadoras de osso. Estas células predestinadas são chamadas células progenitoras ósseas ou células osteogênicas, as quais se originam a partir de células mais primitivas, as células mesenquimais indiferenciadas. Quando há necessidade de regeneração óssea, as células progenitoras ósseas se diferenciam em osteoblastos, que finalmente sintetizam a matriz óssea. Após a formação dos osteoblastos, há emissão de seus prolongamentos citoplasmáticos, criando espaços intercelulares entre eles. Os osteoblastos iniciam então a produção e secreção da matriz orgânica – colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas, osteocalcina, osteonectina, dentre outras – nesses espaços. Após a formação da matriz osteóide,

inicia-se o processo de mineralização através da deposição de íons cálcio e fósforo na forma de hidroxiapatita. Uma vez mineralizada, as células osteoblásticas rodeadas pela matriz passam a se chamar osteócitos (ELIAS, 2001).

Segundo DAVIES (2003), os osteoblastos são as únicas células que sintetizam a matriz óssea. O crescimento ósseo ocorre apenas por aposição, ou seja, deposição de matriz em uma superfície óssea pré-existente ou na superfície de um implante bioativo. O autor ressalta ainda que a matriz óssea mineralizada perde totalmente a sua capacidade de crescimento, característica que a diferencia dos outros tecidos conjuntivos.

3.4.3 OSTEOGÊNESE À DISTÂNCIA E OSTEOGÊNESE DE CONTATO

Na osteogênese à distância, o osso “de novo” é formado na superfície do osso pré-existente, e não na superfície do implante. Este se torna, num segundo momento, rodeado por osso “de novo” (OSBORN, 1980; DAVIES, 2003). De acordo com SUL (2003), a cicatrização ao redor dos implantes usinados ocorre através desse processo de mineralização gradual do osso em direção ao implante. As células em contato com a superfície permitem a mineralização óssea, mas o titânio não age como indutor. O tempo de cicatrização desses implantes sem tratamento superficial é lento, visto que as propriedades da camada do óxido natural levam mais tempo para serem afetadas.

Na osteogênese de contato, o osso “de novo” é formado primeiramente na superfície do implante, logo, esta superfície tem que ser colonizada por células osteogênicas antes que a formação da matriz tenha começado (OSBORN, 1980). O fenômeno da osteogênese de contato está intimamente ligado ao fenômeno da osteocondução e conseqüente formação óssea (FIG. 3.2) (DAVIES, 2003).

A osteocondução é o aspecto mais importante da cicatrização inicial periimplantar. Consiste no recrutamento de células osteogênicas e migração das mesmas para a superfície do implante, visando a formação óssea diretamente na superfície. Conclui-se que os estágios mais importantes da cicatrização óssea precedem a sua formação (DAVIES, 2003).

Promover a osteogênese de contato através de tratamentos de superfícies de implantes que possivelmente as tornem osteoindutoras tem se mostrado como um

dos maiores desafios da Ciência dos Materiais, visto que essas superfícies forneceriam maior área de adesão para fibrinas, favoreceriam a adesão de células e assegurariam a estabilidade precoce dos implantes, podendo então ser utilizadas com maior sucesso em osso de pior qualidade ou em áreas de regeneração óssea (DAVIES, 2003).

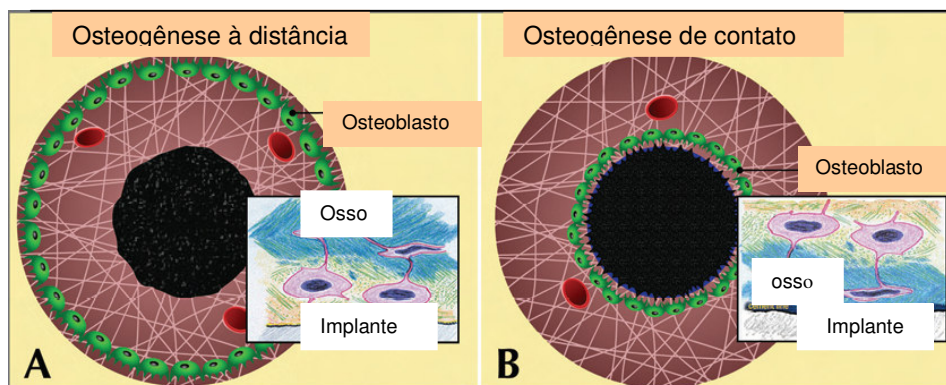


FIG. 3.2: Representação esquemática da osteogênese à distância e da osteogênese de contato (Modificada de DAVIES, 2003).

3.4.4 CASCATA DE EVENTOS BIOLÓGICOS DURANTE A INSTALAÇÃO DO IMPLANTE OSSEOINTEGRÁVEL

Durante preparação do sítio e instalação de um implante osseointegrável no tecido ósseo, vários eventos ocorrem simultaneamente, entre eles a adsorção de proteínas plasmáticas à superfície de titânio, danos aos vasos sanguíneos, aparecimento de eritrócitos, plaquetas e leucócitos no local. A ativação plaquetária, que ocorre após 5 segundos do trauma cirúrgico, induz o processo de degranulação e secreção de fatores de crescimento para o meio extracelular (PDGF, TGF- β , serotonina e histamina). Essa ativação tem um papel importante no recrutamento, migração e proliferação de células osteogênicas e angiogênicas (ROBERTS, 1987).

O processo de degranulação de plaquetas consiste na secreção de metabólitos do ácido aracdônico (fosfolipídeos), que causam vasoconstrição, e interagem com os fatores de coagulação V e X, causando a conversão da protrombina em trombina, a qual cliva os fibrinopeptídeos do fibrinogênio para produzir a fibrina do coágulo. Depois de cessado o processo hemorrágico, ocorre isquemia e necrose do tecido

ósseo peri-implantar (1mm). Os mecanismos de resposta, dentre os quais se destacam os fatores de sinalização e quimiotaxia, levam à destruição do coágulo por leucócitos que aparecem no local do trauma após aproximadamente 10 minutos (DAVIES, 2003)

Inicialmente, os neutrófilos são predominantes, mas depois os macrófagos se tornam os mais numerosos. Os osteoclastos, macrófagos multinucleados, reabsorvem o osso necrótico através dos mecanismos de fagocitose. Estas células também são muito importantes no processo de remodelação óssea (DAVIES, 2003)

A infiltração de glóbulos brancos é seguida pela invasão do sítio cirúrgico pelas células osteogênicas, que migram em direção à superfície do implante através da matriz tridimensional de fibrina. Durante esta migração, ocorre contração desta matriz. A habilidade que a superfície do implante tem para reter esta fibrina durante o processo de contração da matriz é de fundamental importância, e determina se a migração das células irá ou não atingir a superfície (FIG. 3.3) (DAVIES, 2003).

No momento em que as células osteogênicas atingem o implante, tornam-se disponíveis para sintetizar o osso “de novo” em sua superfície. Células osteogênicas diferenciadas se transformam em osteoblastos ativos com a polarização dos núcleos e secreção de matriz óssea por aposição (DAVIES, 2003).

O estágio inicial da formação óssea consiste na secreção da matriz orgânica cementária sem colágeno, que possui sítios de nucleação para induzir a mineralização por íons cálcio e fosfato. São identificadas nessa matriz proteínas não-colágenas, como osteopontina, sialoproteína e proteoglicanos. Após sua mineralização, inicia-se a formação de osso “de novo”. Dessa forma, pode-se concluir que o compartimento colagenoso do osso neoformado é separado da superfície do implante por uma camada de tecido calcificado livre de colágeno ou matriz cementária (DAVIES, 2003).

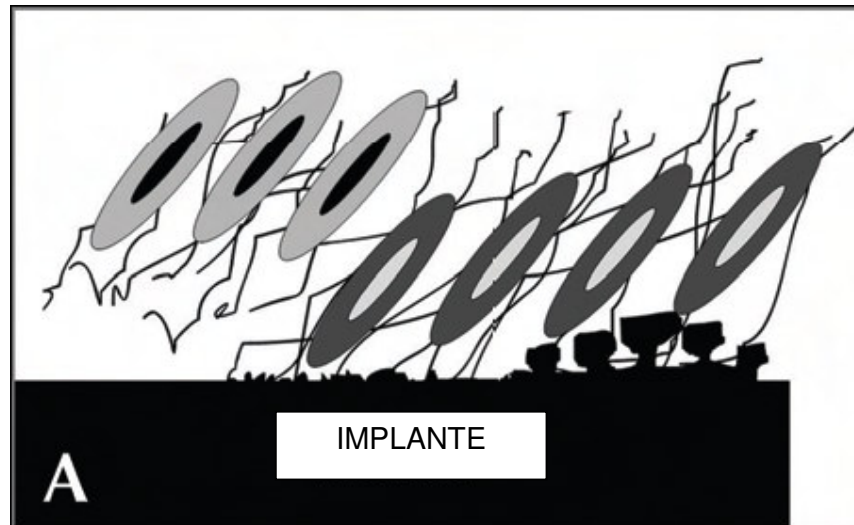


FIG. 3.3: Esquema da retenção da rede de fibrina pela superfície lisa e rugosa do implante (Modificada de DAVIES, 2003).

3.4.5- INFLUÊNCIA DAS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO NA INTERAÇÃO CELULAR

ANSELME (2000) cita duas linhas de pesquisa dentro do campo da engenharia de tecidos, sendo elas a associação de fatores ósseo-indutores a implantes e a associação de células indiferenciadas a esses implantes híbridos. Para ambas as linhas de pesquisa, o entendimento dos fenômenos de adesão celular e o conhecimento das proteínas envolvidas nesta adesão (proteínas da Matriz Extracelular, proteínas do citoesqueleto, caderinas, integrinas, dentre outras) são cruciais. O autor ressalta que as características da superfície do biomaterial determinarão quais moléculas irão adsorver, ao passo que a natureza e orientação destas terão consequências diretas no recrutamento, ancoragem, proliferação e diferenciação das células. A ancoragem celular requer a presença de proteínas de ligação específicas, enquanto a proliferação e a diferenciação requerem fatores de crescimento e citocinas.

Atualmente, as pesquisas tendem a ser multidisciplinares, envolvendo estudiosos de vários campos do conhecimento, como Biologia Celular, Fisiologia Celular, Engenharia de Materiais, Implantodontia, Mecânica, Matemática e Veterinária (ELIAS, 2005; GIL, 2009). Esses trabalhos facilitam as análises de comportamento *in vitro* e *in vivo* de osteoblastos quando em contato com diferentes morfologias superficiais de titânio.

Segundo GIL (2009), osteoblastos humanos tendem a se associar a substratos, biológicos ou não, quando se deparam com eles. A força e a tensão que tais células passam a exercer sobre o substrato poderão ser transmitidas ao núcleo via proteínas intracelulares, e a ativação gênica poderá resultar na ativação ou na inibição de respostas celulares. A mecanotransdução, fenômeno associado aos mecanismos pelos quais forças mecânicas são reconhecidas e traduzidas pelas células em respostas bioquímicas, se faz a partir de pontos de tensão isométrica denominados adesão focal (MENEZES, 2003; GIL, 2009). Tais pontos de tensão não ocorrem aleatoriamente nas superfícies, sendo que o corpo celular se encontra geralmente nos vales e os prolongamentos citoplasmáticos nos picos das superfícies. De acordo com os resultados obtidos no estudo de GIL (2009), concluiu-se que a morfologia e a mecânica das superfícies de titânio preponderaram no primeiro contato com as células.

3.5 FIBRONECTINA

A fibronectina é um dos mais importantes componentes da Matriz Extracelular. É uma glicoproteína dimérica, encontrada em todos os vertebrados sob duas formas fundamentais: solúvel (plasma sanguíneo e outros fluidos) e insolúvel (Matriz Extracelular de diversos tecidos). Possui peso molecular entre 440000 e 500000 daltons. Cada subunidade possui uma porção amino-terminal e uma porção carboxi-terminal. Pontes dissulfeto ligam uma subunidade à outra, próximo à porção carboxi-terminal de cada uma delas. Possuem dobras que levam à remodelação estrutural e diversas conformações de acordo com o meio (FIG. 3.4) (MENEZES, 2003; PARK, 2006; ANTIA, 2008).

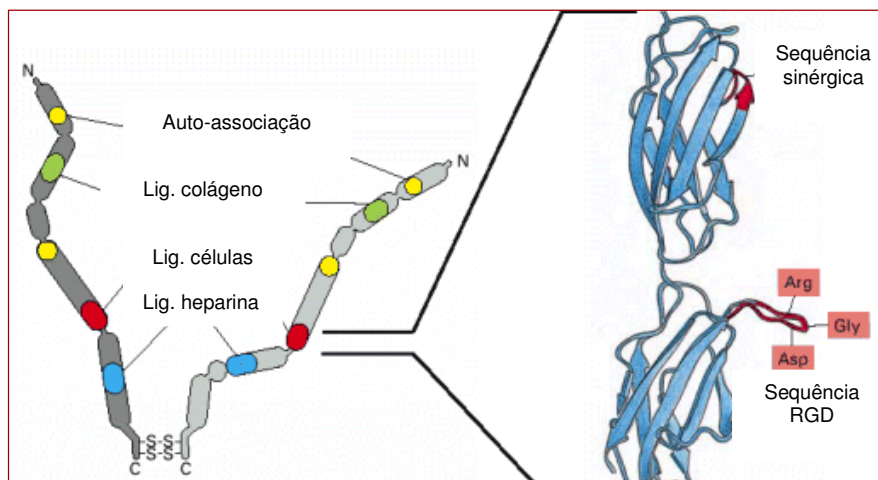


FIG. 3.4: Representação esquemática da fibronectina e alguns de seus sítios de ligação (Modificada de <http://www.unb.br/ib/cel/pg/matrizextracelular>, 2006).

As isoformas da FN são codificadas por um único gene com caráter modular. Seus aproximadamente 50 exons codificam três tipos de subunidades homólogas repetitivas, denominadas Tipo I, II e III. Os módulos são classificados pelo tipo e numerados em ordem crescente da porção amino-terminal para a porção carboxi-terminal. Os monômeros são compostos por doze repetições do Tipo I (segmento de aproximadamente 45 aminoácidos), duas do Tipo II (segmentos de aproximadamente 60 aminoácidos) e quinze a dezessete do Tipo III (segmentos de aproximadamente 90 aminoácidos). O domínio Tipo III é um dos mais presentes dentre os domínios proteicos, com homólogos em aproximadamente 2% das sequências animais (ANTIA, 2008).

Dentre as funções da FN, destacam-se a adesão, a migração, a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação celulares, bem como a organização tecidual. A molécula de FN pode interagir com diversas biomoléculas, tais como colágenos, proteoglicanas, heparina, ácido hialurônico, fibrina/fibrinogênio, plasmina, gangliosídeos, componentes do complemento, com ela mesma, e também com proteínas integrais da membrana plasmática das células – integrinas (MIYAMOTO, 1998).

Sabe-se que o arranjo das fibrilas de FN está diretamente relacionado ao arranjo dos filamentos de actina das células, e vice e versa, e que as células parecem gerar tensões sobre a matriz. Visto que as moléculas de FN sofrem tensões, presume-se

que as mesmas possuem alguma característica elástica. O modelo mais aceito para explicar a elasticidade das fibrilas de FN se baseia em características intrínsecas dos módulos consecutivos do Tipo III (ERICKSON, 1994). Este modelo apresenta três fases de elasticidade: a) conformação estendida da molécula em “zigzag” quando não há tensão sobre a mesma, b) conformação alinhada com pequena extensão da molécula, adquirida com a aplicação de pequenas forças, e c) conformação hiper-estendida da molécula, em que há o desdobramento dos módulos individuais e o consequente aumento do comprimento modular em até seis vezes, adquirida com a aplicação de forças maiores (FIG. 3.5) (ERICKSON, 1994).

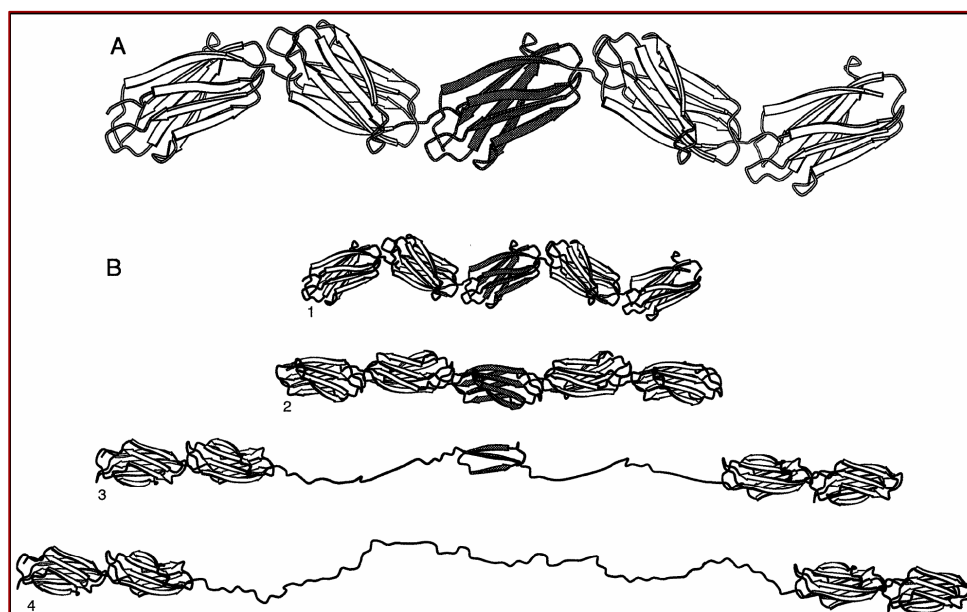


FIG. 3.5: Representação de cinco repetições consecutivas de módulos de FN do Tipo III e o mecanismo de elasticidade molecular. A: conformação estendida, não tensionada, disposta em “zigzag”. B: três estágios de elasticidade molecular. B₁: molécula relaxada em “zigzag”; B₂: alinhamento dos domínios sob baixa tensão; e B₃ e B₄: desdobramento completo do módulo central sob alta tensão (ERICKSON, 1994).

A tensão mecânica é um sinal fisiológico importante para a fibrilogênese. Com a aplicação de tensão, sítios crípticos existentes no interior dos módulos do Tipo III se tornam passivos de interagir com outras moléculas, visto que tais módulos se desdobram e expõem tais sítios, possivelmente nos módulos FNIII¹ e FNIII² (SECHLER, 2001). Os sítios mais instáveis da molécula de FN são os sítios de ligação para as integrinas (FNIII¹⁰ e FNIII¹³), ou seja, inicialmente a proteína se liga à célula para que esta gere forças sobre a própria molécula, estendendo-a e revelando

seus sítios críticos mais estáveis (FNIII¹ e FNIII²), os quais proporcionam a fibrilogênese. Por fim, a matriz fibrilar formada é capaz de modular fenótipos celulares (sinalização e ciclo celular) por mecanotransdução (SCHWARZBAUER, 1999).

MENEZES (2003) realizou um trabalho para avaliar a interação de osteoblastos humanos a filmes de fibronectina plasmática humana constituídos sob diferentes condições de pH. Os resultados demonstraram que não há diferenças quantitativas na interação de células osteoblásticas humanas (HOB) aos diferentes recobrimentos, mas sim diferenças qualitativas, visto que a forma com que os osteoblastos aderem a cada um dos substratos testados é bastante diversa. As células aderidas aos substratos pré-incubados em pH 4,5 apresentaram as maiores áreas de adesão.

3.5.1 INTERAÇÃO FIBRONECTINA-INTEGRINA

A fibronectina possui sítios de interação com várias biomoléculas, incluindo as integrinas. Seu principal sítio de interação celular está localizado no módulo FNIII¹⁰. Este segmento possui a sequência RGD (aminoácidos *arg-gly-asp*), reconhecida por receptores de superfície celular que promovem adesão, mais especificamente a integrina $\alpha_5\beta_1$ em células de mamíferos e $\alpha_{IIb}\beta_3$ em plaquetas. Apesar da significância da sequência RGD para a adesão celular, a interação com integrinas não depende apenas da presença da mesma. O trabalho de NAGAI, em 1991, demonstrou que outras regiões da FNIII (FNIII⁸ e FNIII⁹) agem em sinergismo com a sequência RGD, maximizando a adesão celular.

SCHWARZBAUER (1999), utilizando uma fibronectina mutante que não continha os módulos FNIII¹⁻⁷, demonstrou que certas modulações da progressão do ciclo celular dependem somente da arquitetura da matriz, ou seja, mesmo tendo todos os domínios de interação celular, a matriz fibrilar que desencadeará os processos celulares pode não se formar de maneira eficiente, inibindo a progressão do ciclo.

As interações das moléculas de FN com os receptores da membrana plasmática (integrinas) ocorrem através de contatos focais e sinalizam o processo de

fibrilogênese da seguinte forma: os dímeros de fibronectina se ligam às integrinas das células que, através de seu citoesqueleto de actina exercem força sobre essa molécula, que muda sua conformação e expõe sítios crípticos antes localizados no interior dos módulos, proporcionando a polimerização da molécula de FN em fibrilas. As fibrilas são formas insolúveis que cercam as células e se alinham paralelamente aos microfilamentos de actina. Tais fibrilas aglomeram integrinas ligadas às moléculas de FN, promovendo a formação de densas matrizes fibrilares que regulam o fenótipo celular (FIG. 3.6) (SCHWARZBAUER, 1999).

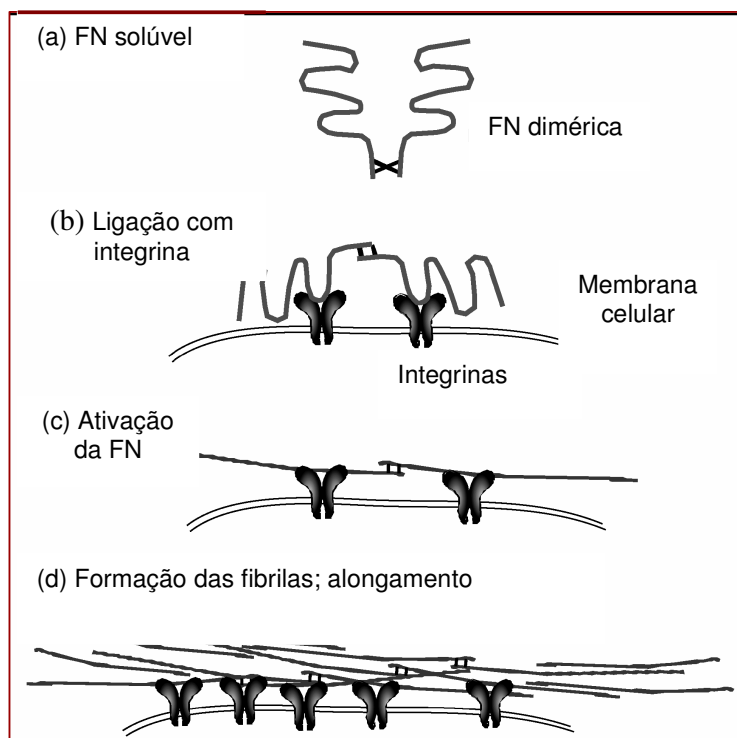


FIG. 3.6: Modelo de fibrilogênese. (a): dímero de FN secretado em uma forma compacta; (b): dímeros de FN se ligam a integrinas na superfície das células; (c): células exercem força sobre as moléculas de FN, expondo sítios crípticos; (d): formação de estruturas que aglomeram integrinas ligadas às moléculas de FN promovendo a formação de matrizes fibrilares que regulam o fenótipo celular (Modificada de SCHWARZBAUER, 1999).

ANTIA (2008) mostrou pela primeira vez evidências de que a matriz fibrilar amadurece, e que este envelhecimento está associado ao aumento da rigidez e estiramento das fibras de FN. As características físicas e bioquímicas da matriz também sofrem transformações com o passar do tempo, permitindo dessa forma que as células reconheçam a idade da matriz.

As integrinas formam uma família de proteínas heterodiméricas ($\alpha\beta$) da membrana plasmática celular composta por diferentes subunidades α (18 variantes)

e β (8 variantes) que definem as especificidades das ligações proteicas. Dentre elas, oito integrinas ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{11b}\beta_3$, etc.) são conhecidas por reconhecer a sequência RGD de aminoácidos em algumas proteínas da MEC, tais como a fibronectina. A ligação das integrinas à RGD induz o agrupamento de mais integrinas e outras moléculas, que se organizam em complexos contatos focais na célula. Estes contatos sinalizam reações celulares, incluindo adesão, espalhamento, reorganização citoesquelética, dentre outras (VAN DER FLIER, 2001; KOKUBUN, 2008).

Os contatos focais clássicos são estruturas alongadas e pontuais localizadas na membrana plasmática das células que se associam à MEC e indiretamente a filamentos de actina pela associação com proteínas citoplasmáticas de ancoragem. Várias interações intermoleculares já foram descobertas demonstrando uma complexa interatividade entre os componentes (ZAMIR, 2001). As proteínas regulatórias Src e quinase de adesão focal (pp125FAK ou FAK) podem se associar entre si e cada qual com várias moléculas, refletindo a função sinalizadora destas moléculas, que estão implicadas na regulação de eventos como espalhamento, migração, sobrevivência e proliferação celulares. Dentre as proteínas estruturais, a vinculina se destaca pelo número de moléculas com as quais pode interagir, merecendo destaque na conexão da actina com componentes vinculados à integrina, como a talina (GERTHOFFER, 2001). Outra propriedade importante dos contatos focais é sua sensibilidade a forças mecânicas, aumentando seu tamanho quando uma carga mecânica é aplicada sobre a superfície celular. Segundo GEIGER (2001), está claro que há um mecanismo de crescimento dos contatos focais e consequente aumento da força de adesão induzido por tração (FIG. 3.7).

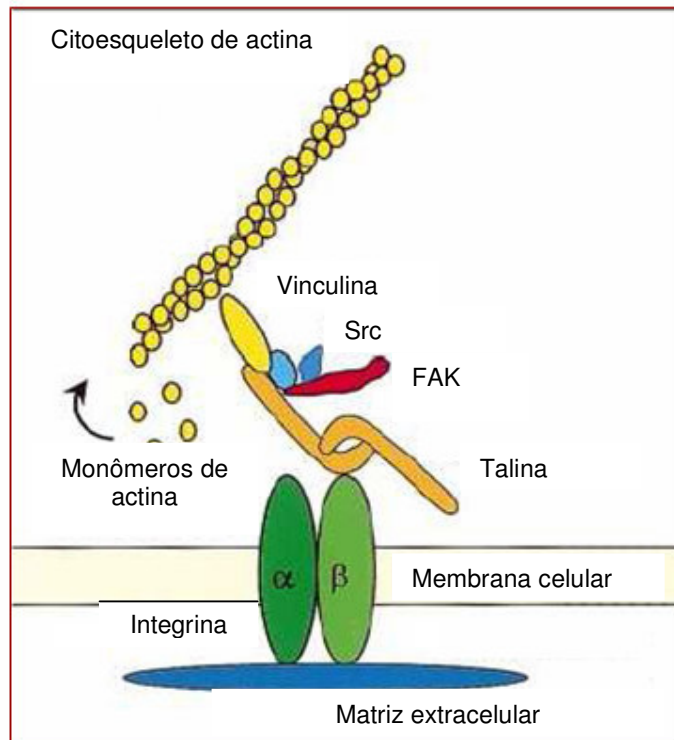


FIG. 3.7: Ilustração esquemática de alguns componentes de um contato focal. As integrinas interligam a MEC ao citoesqueleto de actina através de proteínas de ancoragem como a talina e a vinculina. Outras proteínas se associam à estrutura, mas têm funções de sinalização celular, como, por exemplo, as quinases de adesão focal (FAK) e as Src (Modificada de MENEZES, 2003).

3.5.2 INTERAÇÃO FIBRONECTINA-OSTEOBLASTO

Os osteoblastos e seus precursores produzem fibronectina e interagem com ela pela formação de adesões focais, subsequentemente formando uma matriz da glicoproteína tal qual um fibroblasto (HYNES, 1999). A fibronectina se encontra tanto em locais de maturação de osteoblastos quanto em matrizes mineralizadas, realçando seu papel tanto na transição de células imaturas para estágios mais diferenciados quanto na sobrevivência dessas células, evitando a apoptose das mesmas (GLOBUS, 1998A; GLOBUS, 1998B). No último estudo, o autor ressaltou que para a sobrevivência dos osteoblastos, é necessária a presença da molécula inteira, e não somente das regiões específicas de ligação. Esta questão ainda não

está completamente esclarecida, mas dados referentes a outros tipos celulares sugerem que a resposta esteja na geometria da MEC, seja pela fibrilogênese da FN ou pela disposição espacial da MEC como um todo.

3.5.3 INCORPORAÇÃO DE FIBRONECTINA A SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

A interação de células com a Matriz Extracelular (MEC) é crítica para a regulação das funções celulares, tais como migração, proliferação e sobrevivência. Uma possibilidade de promover adesão celular em implantes de titânio seria modificar a superfície dos mesmos através da incorporação de proteínas da MEC, favorecendo as interações específicas célula-MEC. KU (2005) avaliou a biomimetização de superfícies de titânio tratadas com ataque ácido utilizando fragmentos de fibronectina (FNIII⁸⁻¹⁰) e de vitronectina (VN_{NDT}) recombinantes, que continham sítios de ligação para as integrinas. Células osteoblásticas de ratos (MC3T3 – E1) foram cultivadas sobre as superfícies modificadas e também sobre as superfícies de titânio apenas com ataque ácido, como controle. Foram realizadas técnicas para quantificar células viáveis, adesão e proliferação celulares e também para quantificar as taxas de adsorção de ambas as proteínas recombinantes aos discos de titânio. Os resultados demonstraram um aumento nas taxas de adesão, proliferação e diferenciação celulares nas superfícies incorporadas com fibronectina recombinante quando comparadas com as superfícies incorporadas com vitronectina e as superfícies controle. Além disto, os resultados de adsorção proteica confirmaram que as propriedades de superfície do titânio influenciam na afinidade das proteínas (a FN aderiu mais à superfície que a VN), correlacionando esse fato ao aumento da biocompatibilidade e otimização da osseointegração de implantes com superfícies modificadas com fibronectina.

Em 2006, PARK desenvolveu um estudo para avaliar a osseointegração de implantes com superfícies tratadas com uma proteína artificial formada pela fusão entre fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fibronectina. Dois grupos de amostras foram preparados, ambos tiveram as superfícies anodizadas, mas apenas um grupo foi imerso em uma solução com a proteína fusionada (FGF-FN). Dez implantes foram instalados na tíbia de ratos (um de cada grupo em cada tíbia,

fazendo com que cada rato servisse como seu próprio controle). Após três meses, os animais foram sacrificados para serem realizadas análises histomorfométricas e de torque de remoção dos implantes. O estudo demonstrou que a incorporação da proteína FGF-FN à superfície de implantes anodizados aumenta tanto a porcentagem de contato osso-implante quanto o torque de remoção dos mesmos, otimizando a osseointegração.

Em um trabalho realizado por SCHEIDELER (2003), foi demonstrado que nas superfícies com recobrimentos bioativos, como a FN, as biomoléculas são rapidamente “arrancadas” dessas superfícies quando as amostras são submetidas a condições simuladas de tensão durante a inserção dos implantes. Dessa forma, o autor realizou outro estudo em 2007 para avaliar dois métodos de imobilização química da fibronectina em superfícies de titânio, silanização e antraquinona ativada por radiação ultravioleta, além de avaliar a influência da incorporação dessa proteína na adesão celular e na trombogenicidade. Os resultados demonstraram que o método de incorporação da FN por meio de antraquinona ativada por radiação ultravioleta pode ser muito útil para a biofuncionalização de implantes de titânio.

Em 2008, PETRIE realizou um estudo clínico para avaliar o efeito de recobrimentos bioativos específicos para integrina na cicatrização do tecido ósseo e na osseointegração de implantes dentários de titânio. O autor demonstrou que superfícies contendo o fragmento de FN específico para a integrina $\alpha_5\beta_1$ (FNIII⁷⁻¹⁰) aumentam a diferenciação osteoblástica e otimizam a integração tecidual e funcional quando comparadas com superfícies sem tratamento ou com superfícies que contenham apenas a sequência RGD.

KOKUBUN (2008) utilizou fragmentos de diferentes proteínas para produzir uma proteína recombinante multifuncional. O autor visou produzir artificialmente um componente extracelular com função biológica e especificidade para ligar-se a superfícies de titânio. Esse componente proteico otimizou a ligação entre células osteoblásticas e implantes de titânio comercialmente puro devidamente preparados. Foi sugerido o desenvolvimento de outros estudos objetivando comparar o desempenho de proteínas artificiais multifuncionais com o de proteínas naturais no processo de osseointegração de implantes dentários. Após a realização dos experimentos, os autores ressaltaram a importância da Engenharia de Materiais e da

Biologia Celular na pesquisa de recobrimentos biológicos para funcionalização de superfícies de titânio.

SANTOS (2009) avaliou a interação de células osteoblásticas humanas com superfícies de titânio anodizadas com e sem recobrimento de fibronectina plasmática humana. Os discos de titânio foram preparados e caracterizados por MEV, MFA, DRX e XPS (espectroscopia fotoeletrônica de raios X). Parte das amostras foi incorporada com 10µg/ml de FN, enquanto células HOB foram cultivadas em DMEM (meio modificado de Dulbecco) mais 10% de SBF (soro fetal bovino) até a confluência. Após serem coletadas, centrifugadas, lavadas, ressuspendidas em DMEM fresco e contadas em câmara hematimétrica de Neubauer, as células foram colocadas para reagir com as amostras de titânio, com e sem o recobrimento proteico, durante 30, 120 e 240 minutos. Os resultados da caracterização das amostras indicaram a ocorrência dos óxidos de titânio rutilo e anatase, e a presença de uma topografia de superfície uniforme, com pequenos poros em decorrência do processo de anodização. A incorporação da FN às amostras foi de 68%, avaliada por espectrofotometria a um comprimento de onda de 550nm. A ligação das células às superfícies recobertas aconteceu rapidamente e após 30 minutos as células já se encontravam aderidas, ou seja, espalhadas, às superfícies modificadas com FN. Mesmo após 240 minutos, a maioria das células osteoblásticas humanas não se encontravam espalhadas nas superfícies sem recobrimento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DE TITÂNIO

As amostras utilizadas neste trabalho foram cedidas pela empresa Conexão Sistemas de Prótese (Arujá, SP). Pastilhas de titânio comercialmente puro (ASTM grau IV) de 7 mm de diâmetro por 7 mm de espessura receberam dois tipos de tratamentos de superfície. No primeiro, as amostras foram imersas em soluções ácidas e sofreram passivação em HNO₃, seguindo-se o tratamento da superfície dos implantes comerciais Porous® da empresa Conexão Sistemas de Prótese. No segundo, as amostras foram tratadas por ataque ácido, da mesma forma descrita para a obtenção da superfície Porous®, e em seguida foram imersas em solução contendo íons flúor durante uma hora. Depois de finalizado o processo, as amostras foram lavadas com água destilada e álcool absoluto, secas em um forno a uma temperatura de 70° C por duas horas, embaladas e esterilizadas por irradiação gama (25 kGy). As pastilhas submetidas a esse tratamento de superfície foram denominadas Nano. Os implantes Nano ainda não são comercializados pela empresa e estão em fase de testes. A Conexão Sistemas de Prótese forneceu todas as pastilhas tratadas e esterilizadas.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO POROUS® E NANO

As amostras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução e microscopia de força atômica, com o objetivo de identificar as diferenças na morfologia das superfícies submetidas aos tratamentos com ácidos e/ou fluoretos.

4.2.1 MORFOLOGIA ULTRAESTRUTURAL

4.2.1.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ALTA RESOLUÇÃO

As ultraestruturas das superfícies Porous® e Nano foram inicialmente analisadas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução, equipada com feixe de elétrons gerado por emissão de campo (FEG/EDS – Philips XL 30 FEG, com detector *Oxford Link pentafet x-ray*), pois havia necessidade de grandes aumentos para caracterizar cristais nanométricos. Foram utilizados elétrons secundários acelerados a 25 kV.

4.2.1.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A obtenção de imagens das superfícies das amostras Porous® e Nano foi feita utilizando-se um microscópio de força atômica MFP-3D *Atomic Force Microscope* (*Asylum Research, CA, EUA*) operando em modo contato à temperatura ambiente. Os cantileveres utilizados foram em forma de V, modelo NP-S (*Veeco Probes, CA, EUA*), com constante de mola 0.08 N/m. O método de calibração foi por ruído térmico. Para diminuir danos às amostras e também reduzir ruídos, as imagens foram adquiridas utilizando uma baixa frequência de varredura na ordem de 1.0 Hz, com resolução de 256 X 256 pixels. O processamento de imagem foi feito no programa IGOR-PRO (*Wavemetrics, Portland, OR, EUA*) usando uma plataforma MFP-3D desenvolvida pela *Asylum Research*. Para auxiliar nas análises, as imagens foram dispostas em uma plataforma para visualização tridimensional. Este modo possibilita um maior discernimento dos dados obtidos pelo microscópio de força atômica.

4.2.2 IDENTIFICAÇÃO DAS FASES CRISTALINAS

Um difratômetro de raios X do Departamento de Materiais da Universidade Federal de São Carlos foi utilizado para identificar as fases cristalinas das superfícies Porous® e Nano. A técnica de difração de raios X para análise de filmes finos (técnica de ângulo rasante) foi conduzida a voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA. Um anodo de cobre foi utilizado ($\text{Cu} - \text{K}\alpha = 1.542 \text{ \AA}$), com um gerador RIGAKU, modelo RU 200B, com passo de 0,02%/minuto. A técnica empregada foi descrita previamente no trabalho de BUSQUIM, 2009.

4.3 INCORPORAÇÃO DE FIBRONECTINA

No presente trabalho, fez-se a incorporação de fibronectina (FN) às superfícies Porous® e Nano. Fibronectina sérica humana (Sigma) foi diluída para 10µg/ml, pH 4,5, em tampão acetato de sódio 20 mM (Reagen) previamente filtrado. Foi adicionado NaCl à solução para que a força iônica do meio se mantivesse a 0,145 – 0,150 mol.dm⁻³ (MENEZES, 2003).

As amostras foram recobertas ou não (controles) com fibronectina em temperatura ambiente, por 2 horas. Em seguida, os substratos com FN foram lavados com PBS (salina tamponada [0,15M] com fosfato [0,01M]; pH 7,2) para retirar moléculas não adsorvidas. Um a dois minutos após o descolamento das moléculas adsorvidas com o auxílio da tripsina 0,1% e PBS, foi retirado o excesso e a solução resultante foi recolhida para ser levada ao espectrofotômetro Spectrum 22PC (FIG. 4.1) para quantificar moléculas adsorvidas. A espectrofotometria foi utilizada para determinar a absorbância da FN em ambas as superfícies (concentração da proteína nas soluções que absorve radiação). Foram realizados controles negativo (PBS) e positivo (suspensão de FN 100µg/ml). O comprimento de onda utilizado foi de 550nm (leitura para proteínas).



FIG. 4.1: Espectrofotômetro Spectrum 22PC.

4.4 CULTIVO DE OSTEOLASTOS

Osteoblastos humanos (HOB) cedidos pelo Banco de Células do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (Universidade Federal do Rio de Janeiro) foram utilizados neste trabalho. As células foram mantidas em garrafas de poliestireno contendo meio de cultura DMEM com baixa concentração de glicose (GIBCO), 10% de soro fetal bovino (Soromed), 1% de solução de aminoácidos essenciais (Minimim Essential amino acid solution 100x, Sigma), ácido ascórbico (0,15 g.L⁻¹, Sigma) tamponado com Hepes 10mM (Sigma) e NaHCO₃ 14,3mM (Reagen). O pH do meio de cultivo foi ajustado para 7,2. As culturas foram mantidas em estufa a 37° C, em atmosfera com 5% de CO₂. Para transpor as células da garrafa de cultura estoque aos substratos de ensaio da adesão, foi utilizada a técnica de descolamento enzimático das células. Culturas confluentes foram tratadas com tripsina 0,2% (Difco) e EDTA 0,02% (Sigma) em solução salina (NaCl 0,8% [Reagen]; KCl 0,01% [Sigma]; NaHPO₄.7H₂O 0,29% [Reagen] e KH₂PO₄ 0,02% [Sigma], em H₂O) por 5 minutos a 37°C. Após este tempo, as células desprendidas foram coletadas e a ação proteolítica da tripsina foi inibida pela adição de soro fetal bovino à solução. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 1500 rpm a 22° C e o “pellet” obtido foi resuspendido em meio de cultivo sem soro fetal bovino. A concentração/densidade celular da suspensão obtida foi estimada por contagem em câmara hematómica de Neubauer.

4.5 INTERAÇÃO DE CÉLULAS COM AS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

Depois da contagem da concentração celular da suspensão em câmara hematómica, 10⁶ células/ml foram levadas a interagir com os substratos de titânio Porous® e Nano, com e sem recobrimento de FN, totalizando dois substratos testes e dois substratos controles. Após uma hora de interação, os sobrenadantes foram descartados e as células associadas (adsorvidas e aderidas) às superfícies foram lavadas com PBS e fixadas utilizando glutaraldeído (2,5% em PBS). O glutaraldeído foi utilizado como fixador por exercer sua função sem danificar a integridade da célula (contém dois grupos funcionais que fazem ligação com duas proteínas). Este procedimento foi adotado uma vez que o formaldeído (um grupo funcional apenas)

quando usado para fixar as células, as deforma profundamente (DE SOUZA, 1998). Após fixação, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara hematimétrica de Neubauer.

4.6 RADIOATIVIDADE ASSOCIADA ÀS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

O cultivo de células HOB, citado anteriormente, foi realizado também para avaliar a adesão e a proliferação celulares através de contagem por cintilação líquida. Culturas confluentes de células osteoblásticas humanas (HOB) foram descoladas com tripsina, lavadas e novamente contadas em câmara hematimétrica. Em seguida, a cultura foi ressuspensa em DMEM contendo soro e [³H]-timidina (1143 cpm). Após sua incorporação por um período de 12 horas, a cultura confluenta foi novamente descolada e lavada em DMEM sem soro, e um cintilador líquido (Beckman, Rack III) foi utilizado para se avaliar a radioatividade associada às células. Os valores resultantes foram expressos em contagens por minuto ou cpm. Essas células incorporadas com [³H]-timidina foram associadas às diferentes superfícies (Porous®, Porous com FN, Nano e Nano com FN) por um período de 3 horas, e contagens foram sendo realizadas após 1, 2 e 3 horas. Este método de avaliação do comportamento celular nas amostras de titânio utilizadas neste trabalho permite a reprodução do estudo de maneira precisa, favorecendo a aplicabilidade futura da incorporação de FN às superfícies de implantes utilizados em Odontologia.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO POROUS® E NANO

5.1.1 MORFOLOGIA ULTRAESTRUTURAL

5.1.1.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ALTA RESOLUÇÃO

As figuras 5.1 e 5.2 apresentam eletromicrografias das superfícies de titânio Porous® e Nano, respectivamente, antes de serem recobertas com fibronectina.

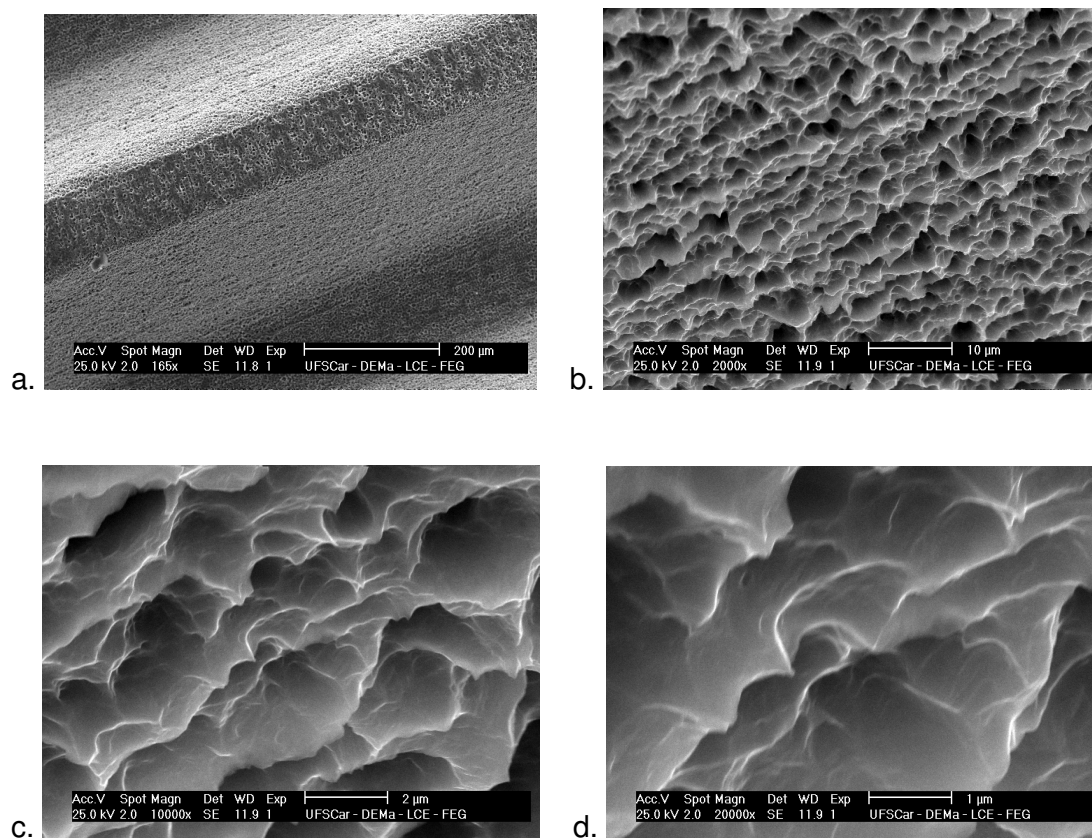


FIG. 5.1: Morfologia da superfície da amostra Porous®

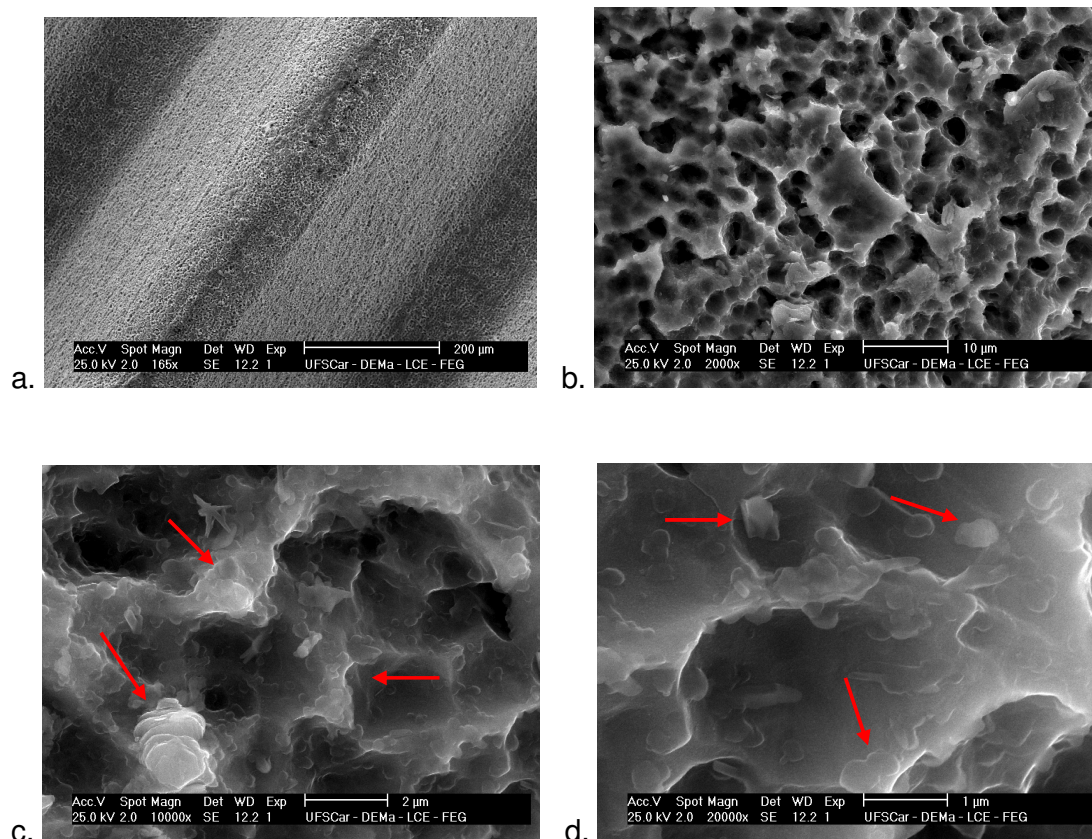


FIG. 5.2: Morfologia da superfície da amostra Nano

Nas mesmas figuras, é possível observar microcavidades com diferentes tamanhos e bordas agudas, demonstrando que a imersão em solução contendo íons flúor (superfície Nano) não altera a morfologia das microcavidades, as quais permanecem com bordas agudas. Uma modificação causada pela imersão é apresentada na figura 5.2b, onde é possível observar algumas regiões mais planas, quando comparada com a figura 5.1b.

Em maiores aumentos (figuras 5.2c e 5.2d), as micrografias revelam a presença de conglomerados (setas) nas amostras em que houve a imersão em solução contendo íons flúor. Esta é a principal característica ultraestrutural da amostra Nano.

5.1.1.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

As figuras 5.3 e 5.4 apresentam imagens obtidas por microscopia de força atômica.

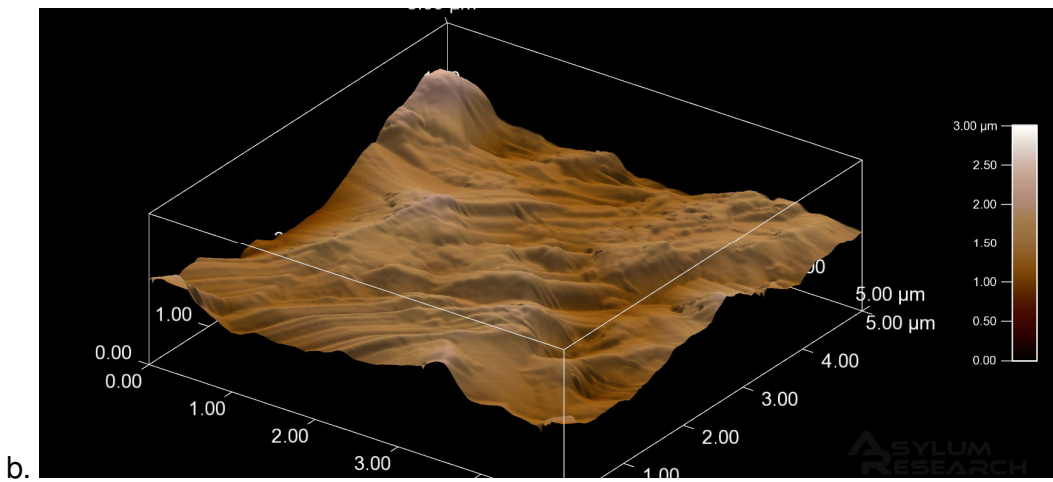
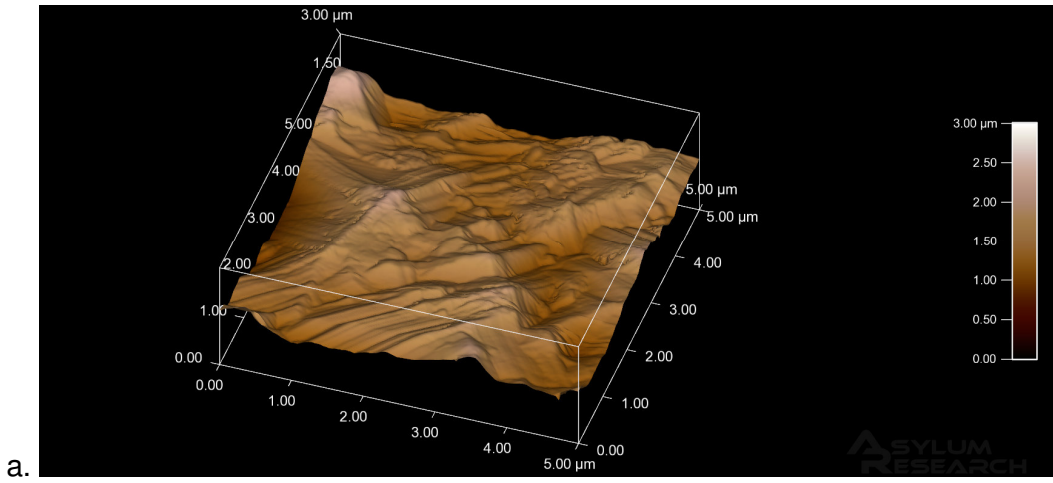


FIG. 5.3: Morfologia da superfície da amostra Porous® em MFA

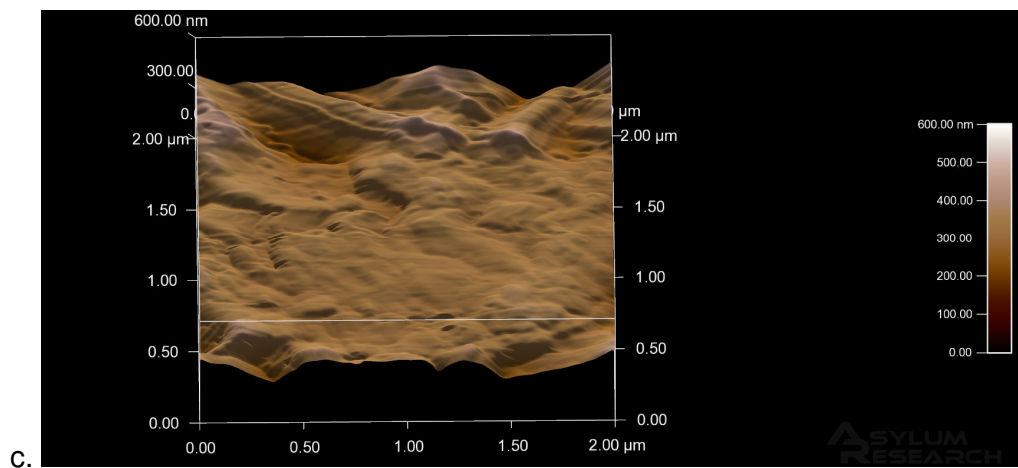
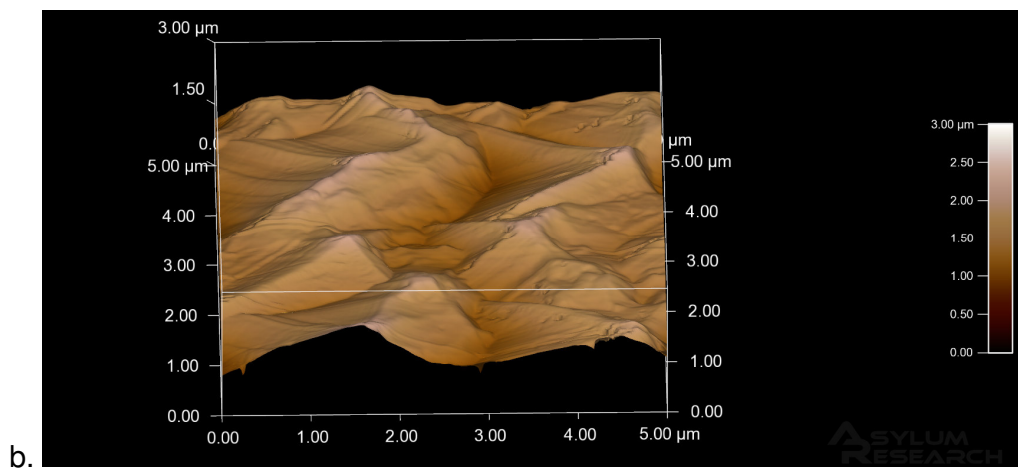
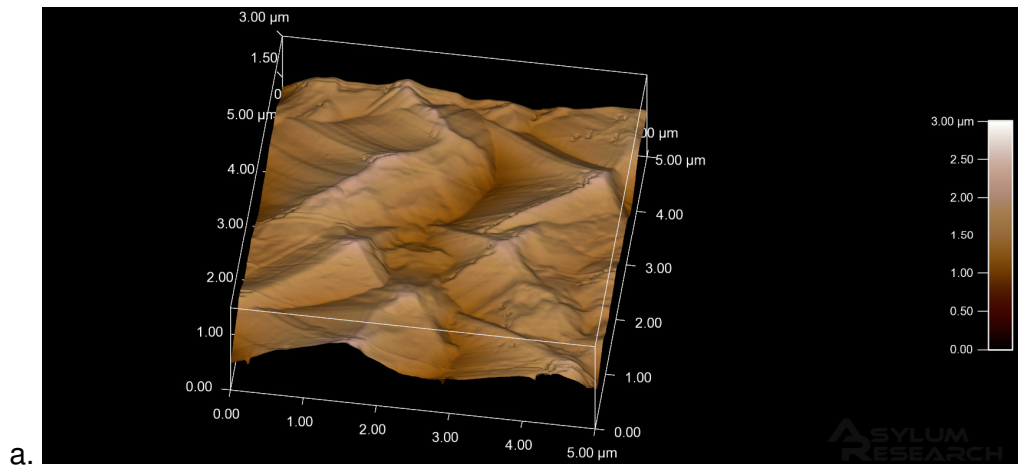


FIG. 5.4: Morfologia da superfície da amostra Nano em MFA

Na figura 5.4a e 5.4b, as bordas das microcavidades apresentam-se mais planas, mas mantêm as características agudas que parecem auxiliar ou facilitar a

adsorção de fibronectina e de células. A figura 5.4c apresenta a amostra Nano em maior aumento, permitindo visualizar o padrão de rugosidade nas bordas das microcavidades, mais planas pelo tratamento de imersão em solução contendo íons flúor.

Na figura 5.3a (amostra da superfície Porous®), a amplitude medida foi de 1759,714nm ($\pm 204,436$ nm), enquanto que na figura 5.4a (amostra da superfície Nano), a amplitude medida foi de 1406,587nm ($\pm 226,953$ nm).

5.1.2 IDENTIFICAÇÃO DAS FASES CRISTALINAS

As figuras 5.5 e 5.6 apresentam espectros de difração de raios X das superfícies Porous® e Nano. Ambos revelaram somente o titânio como fase cristalina.

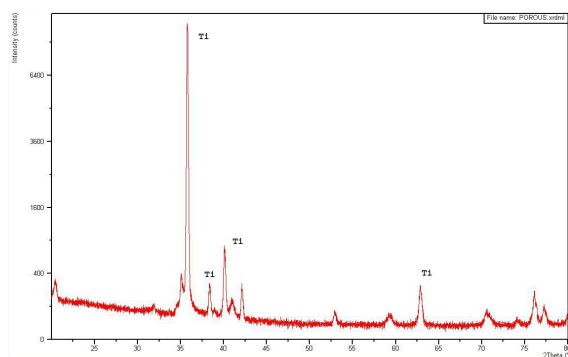


FIG. 5.5: Espectro de difração de raios X da superfície Porous®

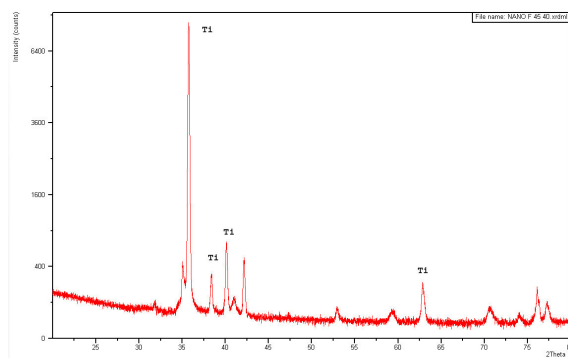


FIG. 5.6: Espectro de difração de raios X da superfície Nano

5.2 INCORPORAÇÃO DE FIBRONECTINA

As superfícies de titânio Porous® e Nano foram levadas a interagir com cristal violeta (1% em PBS). Em seguida, o corante associado às superfícies foi eluído com metanol. Controles negativo (solução tampão) e positivo (suspensão de FN) foram avaliados por espectrofotometria. A 550nm (leitura para proteínas), o PBS resultou em 0,326 unidades de leitura ou de absorbância (UA). No mesmo comprimento de onda, a suspensão de FN (100µg/ml) resultou em 2,992 unidades. Após a incorporação de FN nas pastilhas Porous® e Nano, ambas as medidas espectrofotométricas resultaram em 2,473 unidades de absorbância (82,6%), a 550nm, demonstrando que as duas superfícies apresentam comportamentos semelhantes no que se refere à incorporação de fibronectina, para o tempo ensaiado.

5.3 INTERAÇÃO DE CÉLULAS COM AS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

Um total de 10^6 células osteoblásticas humanas/ml foram levadas a interagir com as superfícies Porous® e Nano, e após uma hora de interação, $7,9 \times 10^4$ células/ml e $2,3 \times 10^5$ células/ml encontravam-se associadas às pastilhas Porous® e Nano (sem recobrimento proteico), respectivamente. A associação de células às duas superfícies, com e sem a incorporação de fibronectina, resultou em índices de associação diferentes (TAB 5.1). Para fins de comparação, consideramos os valores dos índices de associação nulos para as amostras sem FN. Os valores dos índices de associação de células às amostras com FN mostrados na TAB. 5.1 indicam que, em relação às amostras sem FN, houve aumento de 44,7% ($\pm 0,8\%$) e 57,4% ($\pm 0,3\%$) para as superfícies Porous® e Nano, respectivamente.

Superfícies	Fibronectina (10µg.ml⁻¹)	Índice de associação (Δ%)
Porous®	-	zero
Porous®	+	44,7 ± 0,8
Nano	-	zero
Nano	+	57,4 ± 0,3

TAB. 5.1: Associação de células às superfícies Porous®, Porous® com FN, Nano e Nano com FN.

O índice de interação célula-superfície Nano recoberta com FN foi da ordem de 28% maior em relação à superfície Porous com FN.

5.4 – RADIOATIVIDADE ASSOCIADA ÀS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

Após a incorporação de [³H]-timidina por 12 horas, a radioatividade associada às células foi avaliada. Em seguida, 1,8 x 10⁶ células/ml, correspondendo a 1,073 cpm, foram levadas a interagir com as superfícies Porous®, Porous com FN, Nano e Nano com FN.

Após uma hora de interação, observou-se que 70% das células (0,751 cpm) ficaram associadas à superfície Porous®. Isto ocorreu provavelmente porque algumas células morreram ou não se associaram à amostra no início do processo. O número de células associadas aumentou com o tempo de interação, atingindo 0,864 cpm após três horas, ou seja, houve um aumento de 15% de células associadas devido à proliferação e divisão celulares.

Com relação à superfície Porous com FN, 92% das células (0,986 cpm) se associaram após uma hora de interação, e este número aumentou com o tempo, atingindo 1,123 cpm após três horas (aumento de aproximadamente 14%).

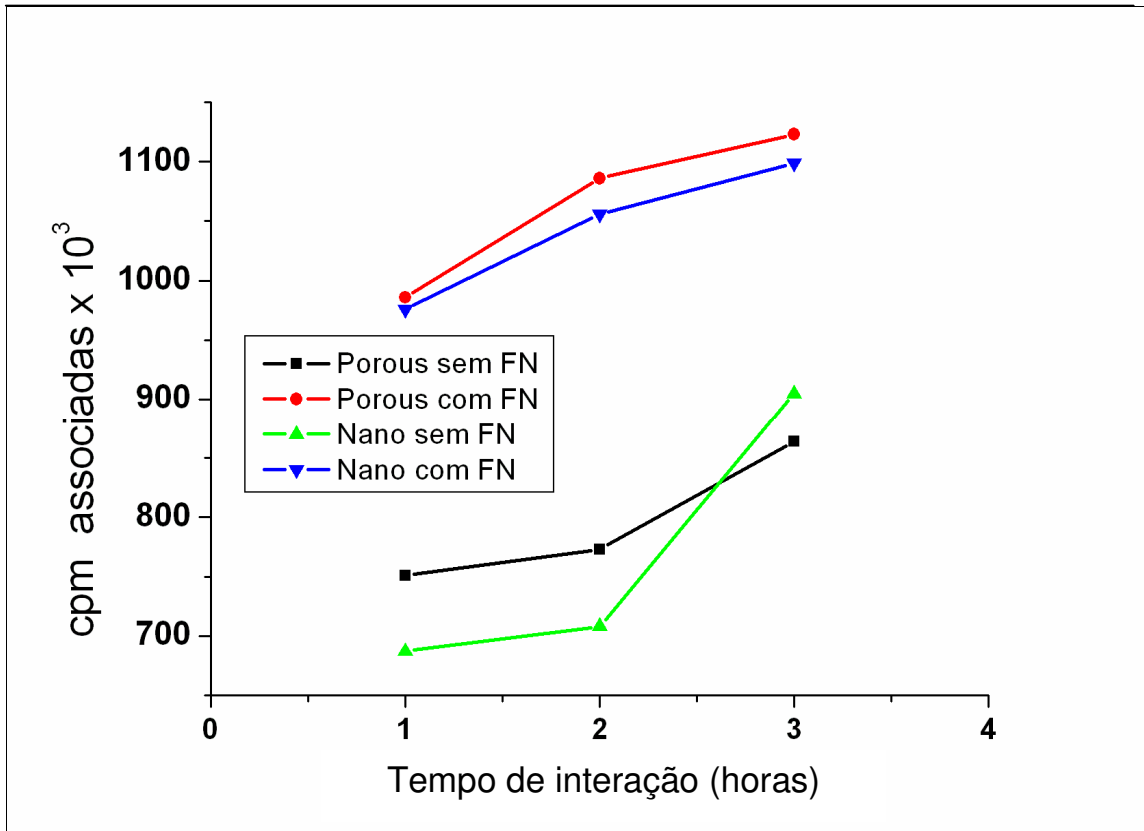
Apenas 64% das células levadas a interagir com a superfície Nano (0,687cpm) permaneceram associadas após um período de uma hora, mas este número aumentou aproximadamente 32% após 3 horas de interação, atingindo 0,905 cpm.

Na superfície Nano com FN, 90% das células (0,976 cpm) se associaram após 1 hora de interação. O número de células associadas aumentou 12% com o tempo, atingindo 1,099 cpm após um período de três horas.

Os resultados descritos estão representados na tabela 5.2 e no gráfico 5.1.

Superfícies	FN	cpm associadas ± SD* (Δt)
-	∅	1,073 ± 0,462
Porous®	-	0,751 ± 0,221 (1 hora)
		0,773 ± 0,332 (2 horas)
		0,864 ± 0,229 (3 horas)
	+	0,986 ± 0,322 (1 hora)
		1,089 ± 0,286 (2 horas)
		1,123 ± 0,206 (3 horas)
Nano	-	0,687 ± 0,187 (1 hora)
		0,708 ± 0,097 (2 horas)
		0,905 ± 0,088 (3 horas)
	+	0,976 ± 0,102 (1 hora)
		1,056 ± 0,102 (2 horas)
		1,099 ± 0,113 (3 horas)

TAB. 5.2: Radioatividade associada às superfícies Porous®, Porous® com FN, Nano e Nano com FN, num intervalo de tempo de três horas (SD = desvio padrão).



GRÁF. 5.1: Radioatividade associada às superfícies Porous®, Porous® com FN, Nano e Nano com FN.

6 DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO POROUS® E NANO

A figura 5.1 mostra a morfologia ultraestrutural da superfície da amostra Porous®, obtida pelo tratamento de imersão em soluções ácidas, promovendo o ataque químico e produzindo uma microtopografia homogênea caracterizada por microcavidades circundadas por micropicos afilados. Este padrão de rugosidade produz uma superfície com características isotrópicas, sem orientação preferencial.

As micrografias da figura 5.2 revelam que o processo de imersão da superfície equivalente à Porous® em solução contendo íons flúor (superfície da amostra Nano) não alterou a morfologia das microcavidades observada na figura 5.1, que permaneceram com bordas agudas. Em um aumento de $2 \times 10^3 \times$, é possível notar a presença de áreas mais planas e micropicos menores, apesar de se manterem afilados. Esta alteração pode estar associada à alta reatividade dos íons flúor e da susceptibilidade química do óxido de titânio a estes íons, produzindo uma coalescência dos picos. Estes resultados corroboram com os resultados dos trabalhos de ELLINGSEN (2003), JOHANSSON (2003) e PINTO (2006), que demonstraram que superfícies de titânio tratadas com fluoretos apresentam microtopografias mais lisas e valores de R_a menores. Em maiores aumentos ($10^4 \times$ e $2 \times 10^4 \times$), pode-se notar a presença de microcavidades maiores, micropicos menores e conglomerados em suas arestas, provavelmente devido ao processo de corrosão e consequente diminuição da rugosidade superficial da superfície submetida à imersão em solução contendo íons flúor.

As imagens obtidas pela microscopia de força atômica (FIG. 5.3 e FIG. 5.4) revelam que as amostras de ambas as superfícies Porous® e Nano apresentam microcavidades circundadas por micropicos afilados. Igualmente aos que foram visualizados por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução, os micropicos e as microcavidades da amostra da superfície Nano possuem arestas mais lisas, apesar de se manterem afiladas. Estas bordas agudas parecem auxiliar ou facilitar a adsorção de FN e de células.

Pela análise das imagens obtidas por MFA, a amplitude medida na amostra da superfície Nano foi menor que a medida na amostra da superfície Porous®, demonstrando que o tratamento com fluoretos causou uma diminuição da altura dos micropicos provavelmente causada pela reação do óxido de titânio com os íons flúor. Este aspecto ultraestrutural dos micropicos contribui para um padrão de rugosidade mais homogêneo da superfície Nano, juntamente com a presença de áreas mais planas e microcavidades maiores.

A presença de apenas uma fase cristalina do titânio foi revelada pela difração de raios X nas amostras das superfícies Porous® e Nano. É provável que o tratamento por imersão em solução contendo íons flúor acrescenta pequena quantidade deste elemento à superfície de titânio, não sendo possível detectá-lo pela técnica de DRX para análise de filmes finos (técnica de ângulo rasante).

6.2 INCORPORAÇÃO DE FIBRONECTINA

Neste estudo, aproximadamente 80% da FN levada a interagir com as superfícies Porous® e Nano adsorveram (2,473 UA). Este resultado demonstra que o tratamento químico com ácidos (Porous®) e o tratamento químico com ácidos seguido de imersão em solução contendo íons flúor (Nano) não apresentaram diferenças no que diz respeito à incorporação da biomolécula, ou seja, a presença do íon flúor não influenciou na adsorção proteica. Na pesquisa de SANTOS (2009), a adsorção de FN às amostras de titânio anodizadas foi de 68%.

Pode-se concluir então que as superfícies de titânio têm afinidade pela fibronectina, e que as diferenças de porcentagem de incorporação nos diferentes trabalhos provavelmente devem-se à condição na qual a FN foi levada a interagir com as superfícies (pH utilizado, por exemplo) e/ou aos diferentes tratamentos realizados nas mesmas.

6.3 INTERAÇÃO DE CÉLULAS COM AS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

A contagem de células em câmara hematimétrica é uma técnica sensível e precisa para avaliação da adesão de células a superfícies de titânio. No presente estudo, os resultados demonstraram que a superfície Nano apresentou maior

associação de células osteoblásticas ($2,3 \times 10^5$ células/ml) que a superfície Porous® ($7,9 \times 10^4$ células/ml), após uma hora de interação. Visto que 10^6 células/ml foram levadas a interagir com as superfícies, cerca de 8% aderiram à amostra Porous®, enquanto que 23% se associaram à amostra Nano. Estes índices percentuais sugerem que a superfície submetida ao tratamento químico seguido de imersão em solução contendo íons flúor favorece mais a adesão de células num período inicial de interação.

Como mencionado anteriormente, os índices de associação às superfícies Porous® e Nano sem fibronectina foram considerados nulos para que pudéssemos avaliar a influência da proteína no comportamento das células. Desta forma, houve um aumento de 57,4% no número de células associadas à superfície Nano com FN quando comparado à mesma superfície sem a variável biológica. Já para a superfície Porous® com FN, o aumento foi de 44,7% em comparação à mesma superfície sem a proteína. Estes índices revelam que a variável proteica é responsável pelo aumento significativo do número de células associadas às superfícies, corroborando com os resultados de KU (2005), que também relatou aumento na taxa de adesão de células a superfícies tratadas com fibronectina recombinante.

Quando comparados entre si, o índice de interação célula-superfície Nano com FN foi da ordem de 28% maior que o da superfície Porous® com FN. Este trabalho demonstra que, dentre os quatro tipos de superfícies analisadas, a Nano com recobrimento de fibronectina é que a mais favorece a adsorção e adesão de células osteoblásticas no período de interação ensaiado. Além disso, a pesquisa fornece dados altamente sugestivos de que a incorporação de FN às superfícies de titânio é muito mais relevante para a biocompatibilidade e conseqüente aceleração do processo de osseointegração do que os tratamentos de superfícies com ácido e/ou imersão em solução contendo íons flúor.

6.4 RADIOATIVIDADE ASSOCIADA ÀS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

Um total de $1,8 \times 10^6$ células/ml (1,073 cpm) foram levadas a interagir com as superfícies de titânio Porous®, Porous® com FN, Nano e Nano com FN, durante um período de três horas. Após uma hora de interação, 92% das células se associaram

à superfície Porous® com FN, e 90% das células se associaram à superfície Nano com FN, enquanto que 70% e 64% das células se associaram às superfícies sem FN, Porous® e Nano, respectivamente. Estes resultados confirmam que o recobrimento proteico das superfícies acelerou a adsorção de células num período inicial de interação (período de adaptação). Isto pode ser justificado pelo fato da fibronectina sinalizar às células e instruir a ativação do ciclo celular e a secreção de proteínas da MEC de osteoblastos, quando levada a interagir com as amostras de titânio em condições ideais de pH para que haja exposição de seus sítios críticos. Os resultados do trabalho de SANTOS (2009) também demonstraram que superfícies recobertas com FN favoreceram a adesão de células num período inicial de interação.

As superfícies Porous® com FN e Nano com FN apresentaram comportamentos semelhantes durante o período de interação de três horas, tanto na adesão inicial das células (aproximadamente 90% para ambas as superfícies) quanto na proliferação das mesmas. O aumento no número de células da primeira à terceira hora de interação foi de 14% para a amostra Porous® com FN e 12% para a Nano com FN (TAB. 5.2). KU (2005) também demonstrou que a biomimetização de superfícies de titânio com fibronectina aumentou as taxas de adesão, proliferação e diferenciação de células.

Com relação às amostras sem FN, o presente trabalho demonstrou que no período de uma a três horas de interação, o número de células associadas à superfície Nano aumentou 32%, enquanto que para a superfície Porous®, este aumento foi de 15%. Esta diferença de valores percentuais revela que a superfície que recebeu tratamento químico seguido de imersão em solução contendo íons flúor (Nano) apresentou uma aceleração dos processos de proliferação e divisão celulares, quando comparada à superfície Porous®. O gráfico 5.1 ilustrou que a superfície Nano sem recobrimento com fibronectina apresentou o maior aumento de cpm associadas em função do tempo ensaiado de três horas. ELLINGSEN (2003), JOHANSSON (2003) e PINTO (2006) demonstraram que superfícies tratadas com fluoretos possuem maior capacidade de reagir com tecidos biológicos e de nuclear cristais de fosfato *in vitro*, além de apresentarem maior resistência de osseointegração *in vivo*. Apesar de terem sido utilizadas diferentes metodologias nos trabalhos com fluoretos citados, é possível relacionar os resultados e concluir que a

presença de íons flúor nas superfícies de titânio facilita os diversos processos que envolvem a osseointegração.

Analisando-se os dados da adesão e proliferação de células obtidos experimentalmente e apresentados no gráfico 5.1, pôde-se observar que o comportamento celular nas amostras contendo fibronectina foi semelhante. Utilizando o programa Origin 7, as retas que interpolaram os dados experimentais da amostra Porous® com FN e Nano com FN apresentaram inclinações equivalentes. Os resultados deste estudo revelam que a FN é fundamental para a biocompatibilidade das superfícies dos implantes de titânio, mas quando esta proteína não está presente, o tratamento com ácidos e fluoretos parece favorecer mais a integração tecidual que o tratamento apenas com ácidos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados deste estudo demonstraram que o tratamento de superfícies de titânio com fluoretos facilita os processos envolvidos na osseointegração. Neste contexto, torna-se muito importante a realização de pesquisas futuras que avaliem se a aceleração da proliferação e da divisão celulares induzidas pela incorporação dos íons flúor às superfícies ocorre devido à mudança mecânica ou química das mesmas.

Para se avaliar o efeito da área superficial resultante de um determinado tratamento de superfície e sua relação com o aumento da capacidade de adsorção da fibronectina, sugere-se para futuros trabalhos a utilização da técnica de BET, que consiste na determinação da área específica de uma superfície pela adsorção de um gás, geralmente o nitrogênio.

A biomimetização de superfícies de titânio com fibronectina constitui-se num método de tratamento de superfícies relativamente recente. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a incorporação da proteína parece acelerar os processos celulares *in vitro*. Torna-se então essencial a realização de trabalhos que avaliem a adesão celular por MEV e a força de adesão através da utilização de uma pinça óptica. Além disto, é necessário avaliar se o recobrimento da superfície com a fibronectina resiste às condições de tensão durante a instalação do implante, e qual seria o melhor método de imobilização da proteína, caso fosse necessário. Para tornar viável a aplicação clínica do tratamento de superfícies proposto (com FN), é imprescindível a realização de estudos *in vivo* a longo prazo.

8 CONCLUSÕES

Com base nos resultados experimentais obtidos, pode-se concluir que:

a) Quanto à morfologia, as técnicas de caracterização utilizadas demonstraram que as superfícies das amostras de titânio tratadas com íons flúor (Nano) mantiveram as características ultraestruturais básicas das superfícies não tratadas com fluoretos (Porous®).

b) As superfícies avaliadas (Porous® e Nano) apresentaram comportamentos semelhantes no que se refere à incorporação de FN (aproximadamente 80%) para o tempo ensaiado (2 horas), demonstrando que a presença de íons flúor não influenciou na adsorção da proteína.

c) Os índices de associação de células HOB às quatro superfícies ensaiadas sugerem que a incorporação de FN às amostras é determinante na citocompatibilidade *in vitro* das superfícies.

d) Apesar da tendência de aumento de cpm associadas às superfícies avaliadas, as amostras previamente tratadas com FN apresentaram percentuais de células associadas significativamente maiores no período inicial de uma hora, confirmando maior influência da variável biológica na adesão e proliferação de células, quando comparada aos diferentes tipos de tratamento de superfícies de titânio utilizados neste estudo.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSSON, I.; ALBOUY, J.-P.; BERGLUNDH, T. Healing at fluoride-modified implants placed in wide marginal defects: an experimental study in dogs. **Clinical Oral Implants Research**, v. 19, n. 2, p. 153–159, 2007.
- AMARANTE, E. S.; LIMA, L. A. Otimização das superfícies dos implantes: plasma de titânio e jateamento com areia condicionado por ácido – estado atual. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v.15, n.2, p. 166–173, 2001.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, n. 7, p. 667-681, 2000.
- ANTIA, M.; BANEYX. G.; KUBOW K. E.; VOGEL V. Fibronectin in aging extracellular matrix fibrils is progressively unfolded by cells and elicits an enhanced rigidity response. **Faraday Discuss.**, v. 139, p. 229-249, 2008.
- BARROS, R. R. M. **A influência da superfície bioativa de implante na osseointegração. Estudo comparativo em cães.** 2009. 115 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, 2009.
- BERGLUNDH, T.; ABRAHAMSSON, I.; ALBOUY, J.-P.; LINDHE, J. Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: an experimental study in dogs. **Clinical Oral Implants Research**, v. 18, n. 2, p. 147-152, 2007.
- BIESBROCK, A. R.; EDGERTON, M. Evaluation of the clinical Predictability of hydroxyapatite-coated endosseous dental implants: A review of the literature. **Int. J. Oral. Maxillofac. Implants**, v. 10, p. 712-720, 1995.
- BRANEMARK P- I. Introduction to Osseointegration. In: Tissue- Integrated Prostheses, **Osseointegration in Clinical Dentistry**. 5^a ed. Chicago: Quintessence Books, 1985, p. 11-76.
- BUSER, D.; NYDEGGER, T.; HIRT, H. P. *et al.* Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 13, p. 611-619, 1998.
- BUSER, D.; SCHENK, R. K.; STEINEMANN, S. *et al.* Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. **J Biomed Mater Res**, v. 25, p. 889-902, 1991.
- BUSQUIM, T. P.; ELIAS, C. N.; MAY, J. E. *et al.* **Titanium Oxide Layer on the Surface of Anodized Dental Implants.** In Materials and Processes for Medical Devices Conference, 2009, Minneapolis: MN. Final Program MPMD. Materials Park, Ohio: ASM The Materials Information Society, 2009, v. 1. p. 50-50.

- CAMARGO, L. O. A. **Avaliação clínica prospectiva de implantes não submersos com tratamento de superfície de jateamento de areia e ataque ácido (sla) submetidos à carga após 6 semanas da cirurgia de instalação.** 2002. 81 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2002.
- CARVALHO, B. M.; PELLIZZER, E. P.; MORAES, S. L. D. *et al.* Tratamentos de superfície nos implantes dentários. **Rev. cir. traumatol. buco-maxilo-fac.** v. 9, n. 1, p. 123-130, 2009.
- CHO, S. A.; PARK, K. T. The removal torque of titanium screw insert in rabbit tibia treated by dual acid etching. **Biomaterials**, v. 24, p. 3611-3617, 2003.
- CORDIOLI, G.; MAJZOUB, Z.; PIATELLI, A.; SCARANO, A. Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: an experimental study in the rabbit tibia. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 15, p. 668-674, 2000.
- DAVIES, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. **Journal of Dental Education**, v. 67, n. 8, p. 932-949, 2003.
- DE SOUZA, W. Ed. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas.** UENF, 1998.
- ELIAS, C. N.; LIMA, J. H. C.; MEIRELLES, L. A. D. **Variação da osseointegração com a rugosidade dos implantes odontológicos.** In SIMPÓSIO MATÉRIA 2000, 2000, Rio de Janeiro: Matéria 2002, 2000, v. 1, p. 1-9.
- ELIAS, C. N., LIMA, J. H. C. Importância da qualidade da superfície dos implantes osseointegráveis na biofixação. **Rev. Bras. Implant.**, v. 7, n. 1, p.21-25, 2001.
- ELIAS, C. N.; LIMA, J. H. C.; FILHO, F. C. S.; MULLER, C. A. Interações de células com diferentes superfícies de implantes dentários. **RBO.** v. 62, n. 1 e 2, p. 119-124, 2005.
- ELLINGSEN, J. E., LYGSTADAAS, S. P. **Increasing biocompatibility by chemical modification of titanium surfaces.** In Bio-Implant Interface: Improving Biomaterials and Tissue Reactions. 1ª ed. Boca Raton: CRC Press, 2003, p. 323-340.
- ERICKSON H. P. Reversible unfolding of fibronectin type III and immunoglobulin domains provides the structural basis for stretch and elasticity of titin and fibronectin. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 10114-10118, 1994.
- FIBRONECTINA. Disponível: <http://www.unb.br/ib/cel/pg/matrizextracelular>, 2006. (capturado em 05 de fevereiro de 2009).

- GEIGER B.; BERSHADSKY A. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. **Curr Opin Cell Biol**, v. 13, p. 584-592, 2001.
- GERTHOFFER W.T.; GUNST S. J. Focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle **J Appl Physiol**, v. 91, p. 963-97, 2001.
- GIL, L. M.; LADEIRA, T. C.; MENEZES, G. C.; SILVA-FILHO, F. C. The cell-extracellular matrix-biomaterial interface and the biocompatibility of titanium implants. **Innov. Implant J.**, vol. 4, n. 3, p. 58-64, 2009.
- GLOBUS R. K., DOTY S. B., LULL J. C., HOLMUHAMEDOV E., HUMPHRIES M. J.; DAMSKY C. H. Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts, **J Cell Sci**, v. 111, p. 1385-1393, 1998a.
- GLOBUS R. K., MOURSI A. M., LOPEZ V.; DAMSKY C. H. **Role of fibronectin and its integrin receptors in the maturation and function of cultured osteoblasts.** In Biological Mechanisms of Tooth Eruption, Resorption and Replacement by Implants (Davidovitch Z. & Mah J., eds.), Harvard Society for the Advancement of Orthodontics, Boston: 1998b, p. 353-360.
- HELMUS, M. N.; TWEDEN; K., **Materials selection.** In Encyclopedia Handbook of Biomaterials and Bioengineering, 1995, v. 2, part A, p. 1429-1463.
- HÖSTNER, C. H. **On the bone response to different implant textures. A 3D analysis of roughness, wavelength and surface pattern of experimental implants.** PhD Dissertation, Göteborg University, 2001.
- HYNES, R. O. The dynamic dialogue between cells and matrices: Implications of fibronectin's elasticity. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p. 2588-2590, 1999.
- JANSEN, O. T, SHULMAN, L. B, BLOCK, M. S, IACONO, V. J. Report of the sinus consensus conference 1996. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 13, p. 11-45, 1998.
- JOHANSSON, C. B., *et al.* **Enhanced fixation of bone to fluoride-modified implants.** Sixth World Biomaterial Congress, 2000. In Bio-Implant Interface: Improving Biomaterials and Tissue Reactions. 1^a ed. Boca Raton: CRC Press, 2003, p. 323-340.
- KASEMO, B. Biological surface science. **Surface Science**, v. 500, p. 656–677, 2002.
- KOKUBUN, K.; KASHIWAGI, K.; YOSHINARI, M.; INOUE, T.; SHIBA, K. Motif-Programmed Artificial Extracellular Matrix. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 3098-3105, 2008.
- KU, Y.; CHUNG, C.; JANG, J. The effect of the surface modification of titanium using a recombinant fragment of fibronectin and vitronectin on cell behavior. **Biomaterials**, v. 26, p. 5153-5157, 2005.

- LIMA, J. H. C., ELIAS, C. N., MEIRELLES, L. A. A osseointegração em diferentes tipos de superfícies do implantes osseointegráveis. **Odontologia: Arte e Conhecimento**. Editora Artes Médicas Ltda, São Paulo. Cap. 16, p. 353-365, 2003.
- MARIN, C.; GRANATO, R.; SUZUKI, M.; GIL, J. N.; PIATTELLI, A.; COELHO, P. G. Removal torque and histomorphometric evaluation of bioceramic grit-blasted/acid-etched and dual acid-etched implant surfaces: an experimental study in dogs. **J_Periodontol.**, v. 79, n. 10, p. 1942-9, 2008.
- MAY, J. E.; BUSQUIM, T. P.; KURI, S. E.; NASCENTE, P. A. P.; ELIAS, C. N. Caracterização do óxido de titânio formado nas superfícies Vulcano Actives e TiUnite. **Rev. Bras. Implant.**, v. 13, p. 6-10, 2008.
- MENDONÇA, R. H. **Imobilização de fibronectina na superfície de suportes porosos de phb para aplicação em engenharia óssea**. 2008. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- MENEZES, G. D. **A Interação de Osteoblastos Humanos com Filmes de Fibronectina Plasmática Humana Constituídos Sob Diferentes Condições de pH**. 2003. 105 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, 2003.
- MISCH, C. E. **Contemporary Implant Dentistry**. Mosby – St Louis. 1999.
- MIYAMOTO, S.; KATZ, B. Z.; LAFRENIE R. M.; YAMADA K. M. Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. **Ann NY Acad Sci**, v. 857, p. 119-129, 1998.
- MONJO, M.; LAMOLLE, S. F.; LYGSTADAAS, S. P.; RONOLD, H. J.; ELLINGSEN, J. E. *In vivo* expression of osteogenic markers and bone mineral density at the surface of fluoride-modified titanium implants. **Biomaterials**, v. 29, n. 28, p. 3771-80, 2008.
- NAGAI, T.; YAMAKAWA, N.; AOTA, S.; YAMADA, S. S.; AKIYAMA, S. K.; OLDEN, K.; YAMADA, K. M. Monoclonal antibody characterization of two distinct sites required for function of the central cell-binding domain of fibronectin in cell adhesion, cell migration, and matrix assembly. **J Cell Biol**, v. 114, p. 1295–1305, 1991.
- OSBORN, J. F.; NEWSELY, H. **Dinamic aspects of the implant-bone interface**. In Heimke G. (ed). *Dental Materials: Materials and systems*. Munich: Carl Hanser Verlag, 1980, p. 111-123.
- PARK, J.; KOAK, J.; JANG, J.; HAN, C.; KIM, S.; HEO, S. Osseointegration of Anodized Titanium Implants Coated with Fibroblast Growth Factor-Fibronectin (FGF-FN) Fusion Protein. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 21, n. 6, p. 859-866, 2006.

- PETRIE, T.; RAYNOR, J.; REYES, C. BURNS, K.; COLLARD, D.; GARCIA, A. The effect of integrin-specific bioactive coatings on tissue healing and implant osseointegration. **Biomaterials**, v. 29, p. 2849-2857, 2008.
- PINTO, L. E. S. C.; ELIAS, C. N. Sem analysis of titanium dental implants after fluoride treatment. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, p. 289-290, 2005.
- PINTO, L. E. S. C. **Tratamento químico da superfície de Implantes de Titânio**. 2006. 166 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Militar de Engenharia, 2006.
- ROBERTS, W. E. *et al.* Bone physiology and metabolism. **J Calif Dent Assoc**, v. 15, p. 54-61, 1987.
- ROHRER, M. D.; SOBCZAK, R. R.; PRASAD, H. S.; MORRIS, H. F. Postmortem histologic evaluation of mandibular titanium and maxillary hydroxyapatite-coated implants from 1 patient. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 14, p. 579-586, 1999.
- SANTOS, A. R.; SILVA-FILHO, F. C.; SOARES, G. A. The Interaction between human osteoblastic cells and titanium anodized with sulphuric acid coated or not with human plasma fibronectin. **Key Engineering Materials**, v. 396-398, p. 389-392, 2009.
- SCHEIDELER, L.; GEIS-GERSTORFER, J.; KERN, D.; PFEIFFER, F.; RUPP, F.; WEBER, H. *et al.* Investigation of cell reactions to microstructured implant surfaces. Anonymous. **Mater Sci Eng C**, v. 23, p. 455-459, 2003.
- SCHEIDELER, L.; RUPP, F.; WENDEL, H.; SATHE, S.; GERSTORFER, J. Photocoupling of fibronectin to titanium surfaces influences keratinocyte adhesion, pellicle formation and thrombogenicity. **Dental Materials**. v. 23, p. 469-478, 2007.
- SCHWARZBAUER, J. E.; SECHLER, J. L. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. **Curr Opin Cell Biol**, v. 11, p. 622-627, 1999.
- SECHLER, J. L.; RAO, H.; CUMISKEY, A. M.; VEGA-COLN, I.; SMITH, M. S.; MURATA, T.; SCHWARZBAUER, J. E. A novel fibronectin binding site required for fibronectin fibril growth during matrix assembly. **J Cell Biol**, v. 154, p. 1081-1088, 2001.
- SUL, Y. T.; JOHANSSON, C.; JEONG, Y.; ALBREKTSSON, T. The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. **Medical Engineering and Physics**, v. 23, p. 329-346, 2001b.
- SUL, Y. T. **On the bone response to oxidized titanium implants: The role of microporous structure and chemical composition of the surface oxide in enhanced osseointegration**. 2002. PhD Dissertation, Göteborg University, 2002f.

- SUL, Y. T. The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: Special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant. **Biomaterials**, v. 24, p. 3893-3907, 2003.
- SUL, Y. T., BYON, E. S., JEONG, Y. Biomechanical measurements of calcium-incorporated oxidized implants in rabbit bone: Effect of calcium surface chemistry of a novel implant. **Clin. Implant Dent. Relat. Res.**, v. 6, p. 101-110, 2004.
- SUL, Y. T., JOHANSSON, P., CHANG, B. S., BYON, E. S., *et al.* Bone tissue response to Mg-incorporated oxidized implants and machined-turned implants in the rabbit femur. **Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics**, v. 1, p. 18-28, 2005c.
- SUL, Y. T.; JOHANSSON, C; ALBREKTSSON, T. Which surface properties enhance bone response to implants? Comparison of oxidized magnesium, TiUnite, and Osseotite implant surfaces. **Int J Prosthodont.**, v. 19, n. 4, p. 319-28, 2006.
- SYKARAS, N.; LACOPINO, A. M.; MARKER, V. A.; TRIPLETT, R. G. *et al.* Implant materials, designs and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 15, p. 675-690, 2000.
- UEHARA, T.; TAKAOKA, K.; ITO, K. Histological evidence of osseointegration in human retrieved fractured hydroxyapatite-coated screw-type implants: a case report. **Clin Oral Implants Res.** v. 15, n. 5, p. 540-5, 2004.
- VAN DER FLIER, A.; SONNENBERG, A. Function and interactions of integrins. **Cell Tissue Res**, v. 305, p. 285-298, 2001.
- VAN OSS, C. J. Unspecific and specific intermolecular interactions. **J Mol Recog**, v. 3, p. 128-136, 1990.
- ZAMIR, E.; GEIGER, B. Components of cell-matrix adhesions. **J Cell Sci**, v. 114, p. 3577-3579, 2001.
- WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T.; LINDHE, J. **Surface topography of titanium implants**. In *Clinical Periodontology and Implant dentistry*, 4th ed., p. 821-825, 2003.
- WONG, M.; EULENBERGER, J.; SCHENK, J. *et al.* Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. **J Biomed Mater Res**, v. 12, p. 1567-1575, 1995.

