

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

VINICIUS DE MAGALHÃES BARROS

***AVALIAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DE
SUPERFÍCIES DE TITÂNIO
REVESTIDAS COM
VIDRO BIOATIVO***

Belo Horizonte
2017

Vinícius de Magalhães Barros

***AVALIAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DE
SUPERFÍCIES DE TITÂNIO
REVESTIDAS COM
VIDRO BIOATIVO***

Tese submetida ao colegiado de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica

Orientador: Allyson Nogueira Moreira

Coorientador: Walison Arthuso Vasconcellos

Belo Horizonte
2017

Ficha Catalográfica

B277a Barros, Vinicius de Magalhães.
2017 Avaliação in vitro e in vivo de superfícies de titânio
T revestidas com vidro bioativo / Vinicius de Magalhães
Barros. -- 2017.

79 f. : il.

Orientador: Allyson Nogueira Moreira.
Coorientador: Walison Arthuso Vasconcellos.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Implantes dentários. 2. Osseointegração. 3. Teste de
materiais. 4. Propriedades de superfície. I. Moreira,
Allyson Nogueira. II. Vasconcellos, Walison Arthuso. III.
Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de
Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047

FOLHA DE APROVAÇÃO

ATA DA DEFESA

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela luz e proteção constantes.

À minha esposa Andréa e meus filhos, Caio e Elisa, pela paciência e compreensão. Por compartilhar as minhas angústias e entender a minha ausência.

Aos meus pais, Flávio e Vaine, exemplos de caráter e dedicação.

Ao professor Allyson Nogueira Moreira pela confiança e por ter aceito o desafio de desenvolver e orientar esse trabalho.

Ao professor Walison Arthuso Vasconcellos pela longa amizade e por compartilhar da sua paixão pela docência e pesquisa.

Ao professor Anderson José Ferreira, do Laboratório de Biologia Cardíaca do ICB-UFMG, pela acolhida e colaboração nesse trabalho.

À Professora Rosana Zacarias Domingues, do LaMPaC do Departamento de Química da UFMG, pela colaboração nesse trabalho.

Aos professores e colegas Marcos Augusto de Sá e Celso Martins Queiroz Júnior, pela colaboração fundamental nos experimentos desse trabalho.

À Ludmila Gonçalves de Oliveira Xavier, pela parceria no desenvolvimento e caracterização química da superfície experimental.

Às Professoras Tarcília Aparecida da Silva e Soraia Macari, pelo suporte e orientação na análise das microtomografias computadorizadas.

A empresa Peclab sistema de implantes dentários, pela doação dos espécimes de titânio.

Ao programa de pós-graduação da FOUFG, pela oportunidade de concluir mais esse desafio.

A todos os meus colegas do Curso de Doutorado.

À Capes e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes”.

Cora Coralina

RESUMO

Objetivo: Esse estudo experimental *in vitro* e *in vivo* testou a capacidade de osseointegração de uma nova superfície de titânio nanoestruturada revestida com vidro bioativo contendo fosfato de cálcio. **Metodologia:** A rugosidade superficial foi avaliada por microscopia de força atômica utilizando 9 corpos de prova dos três diferentes grupos: titânio microtexturizado (Ticp) e revestidos com vidro bioativo e secos nas temperaturas de 37^oC (BGTi37) ou 600^oC (BGTi600). Células osteoblásticas primárias obtidas das calvárias de ratos neonatos foram cultivadas *in vitro* em meio α -MEM suplementado em contato ou não (controle) com discos de titânio microtexturizado (Ticp) e revestidos (BGTi37 e BGTi600). A viabilidade celular e produção de fosfatase alcalina foram avaliadas após 7 dias de cultura e a mineralização após 14 dias de cultura. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. A morfologia dos osteoblastos em contato com as três superfícies foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura após 7 e 14 dias. Quatorze parafusos de titânio microtexturizados (Ticp -controle) e quatorze parafusos experimentais revestidos com vidro bioativo e secos à 37^oC (BGTi37) foram instalados aleatoriamente nas tíbias de 14 ratos Wistar. Os animais foram eutanasiados após 14 e 28 dias e suas tíbias preparadas e analisadas por microtomografia computadorizada. **Resultados:** O grupo Ticp apresentou a maior rugosidade média (129,6 nm), seguido do grupo BGTi600 (91,85 nm), que foram estatisticamente semelhantes. O grupo BGTi37 apresentou a menor rugosidade (74,51 nm), sendo significativamente menor do que os outros dois grupos. A proporção de células viáveis, a produção de fosfatase alcalina e a mineralização do grupo BGTi600 foi significativamente menor do que as do grupo controle e do Ticp. Para os demais grupos (BGTi37, Ticp e controle), a proporção de células viáveis, produção de fosfatase alcalina e mineralização foram semelhantes. O número de osteoblastos em contato com todas as superfícies foi maior no período de 14 dias comparado ao período de 7 dias. A maior quantidade de osteoblastos foi observada em contato com a superfície de Ticp e a menor quantidade em contato com a superfície de BGTi600. Os osteoblastos em contato com a superfície Ticp apresentaram-se com morfologia poligonal e maiores do que os dos grupos BGTi37 e BGTi600, que apresentam-se com morfologia mais alongada, mais notadamente no grupo BGTi600. A quantidade de prolongamentos citoplasmáticos, junções intercelulares e vesículas observadas nos espécimes do grupo BGTi600 foi notadamente menor do que nos grupos Ticp e BGTi37. Os parâmetros avaliados por microtomografia computadorizada da cortical e da medular ósseas em torno dos parafusos experimentais (BGTi37) e controles (Ticp) foram estatisticamente semelhantes. **Conclusões:** A superfície BGTi37 apresentou comportamento biológico semelhante à uma superfície de titânio microtexturizada (Ticp), com ótimos resultados de longo prazo já consolidados na literatura. Fato bastante promissor, considerando as possibilidades de aprimoramento dessa superfície experimental em futuros estudos.

Descritores: implantes dentários, osseointegração, teste de materiais, modificações de superfície.

ABSTRACT

***In vitro* and *in vivo* evaluation of a bioactive titanium surface modified by bioglass coating**

Objectives: This experimental *in vitro* and *in vivo* study tested the osteoinduction ability of a new nanostructured titanium surface coated with bioglass with calcium phosphate. **Methods:** Surface roughness was evaluated by atomic force microscopy using 9 specimens of three groups: sandblasting and acid etching commercially pure titanium (cpTi) and bioglass coated dried at temperatures of 37⁰C (BGTi37) or 600⁰C (BGTi600). Rat calvarial osteogenic cells were cultured in supplemented α -MEM medium in contact or not (control) with sandblasting and acid etching (SLA) commercially pure titanium discs (cpTi) and bioglass coated (BGTi37 and BGTi600). Cell viability and alkaline phosphatase (ALP) activity were measured after 7 days of culture. The mineralization was assessed after 14 days of culture. The data were compared by analysis of variance (ANOVA) complemented by Tukey test. The level of significance was 5%. Scanning electron microscopy after 7 and 14 days assessed osteoblasts morphology in contact with the three surfaces. Fourteen SLA commercially pure titanium screws (cpTi -control) and fourteen experimental screws bioglass coated dried at temperatures of 37⁰C (BGTi37) were randomly placed into 14 male Wistar rats' tibiae. The animals were sacrificed after 14 and 28 days and their tibiae processed for micro-CT analysis. **Results:** The cpTi group (129.6 nm) showed the highest average roughness, followed by BGTi600 group (91.85 nm), which were statistically similar. The BGTi37 group (74.51 nm) showed the lowest surface roughness compared to the other two groups. Cell viability, ALP activity and mineralization of BGTi600 group were significantly lower than the control and cpTi groups. BGTi37, cpTi and control groups showed no significant differences in cell viability, ALP activity and mineralization. The number of cells in contact with all surfaces was higher in 14 days compared to 7 days. Higher amount of osteoblasts was observed in contact with the cpTi surface and the smaller amount in contact with the BGTi600 surface. Osteoblasts in contact to cpTi surface showed a flat polygonal shape and were larger than the BGTi37 and BGTi600 groups, which presented with a sharper morphology, most notably in the BGTi600 group. The number of cytoplasmic processes, intercellular junctions and vesicles observed in specimens of BGTi600 group was markedly lower than in cpTi and BGTi37 groups. The micro-CT parameters of the cortical and trabecular bone around the experimental (BGTi37) and controls (Ticp) screws presented no statistical differences. **Conclusions:** The BGTi37 surface showed biological behavior similar to a SLA titanium surface (cpTi), with excellent long-term results already established in the literature. A very promising fact, considering the improvement possibilities of this experimental surface in future studies.

Keywords: dental implants, osseointegration, materials testing, surface modification.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Divisão e número dos espécimes nos grupos controle e experimentais.....	35
FIGURA 2: Imagens ilustrativas do procedimento cirúrgico para instalação dos parafusos controle e experimental nas tíbias dos ratos. A – Patas traseiras após tricotomia; B – colocação do campo cirúrgico; C – assepsia da pata com solução de iodo; D – incisão na porção ântero-medial da tíbia; E – descolamento e afastamento do retalho; F – perfuração com broca helicoidal.	44
FIGURA 3: Imagens ilustrativas do procedimento cirúrgico para instalação dos parafusos controle e experimental nas tíbias dos ratos. A – perfuração sob irrigação com solução salina resfriada; B – perfuração finalizada; C – parafuso acoplado a chave manual de inserção; D – instalação do parafuso até alcançar estabilidade primária; E – reposicionamento da musculatura; F – retalho suturado após nova assepsia com solução de iodo.	45
FIGURA 4: Imagem tridimensional do parafuso instalado na tíbia.	47
FIGURA 5: Imagem após a reconstrução pelo <i>software</i> NRecon.....	47
FIGURA 6: Topografia por microscopia de força atômica (10 X 10 μm^2 e 5 X 5 μm^2) das superfícies Ticp, BGTi37 e BGTi600.	49
FIGURA 7: Rugosidade quadrática média (Sq) e rugosidade aritmética (Sa) em nanômetros das superfícies Ticp, BGTi37 e BGTi600. Barras com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ($p > 5\%$) (ANOVA seguido por teste de Tukey)	50
FIGURA 8: Viabilidade celular (MTT %) dos osteoblastos cultivados por 7 dias na ausência de qualquer substrato (C) ou em contato com as superfícies Ticp, BGTi37 e BGTi600. Barras com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ($p > 5\%$) (ANOVA seguido por teste de Tukey).	51
FIGURA 9: Produção de fosfatase alcalina (unidades relativas) dos osteoblastos cultivados por 7 dias na ausência de qualquer substrato (C) ou em contato com as superfícies Ticp, BGTi37 e BGTi600. Barras com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ($p > 5\%$) (ANOVA seguido por teste de Tukey).	52
FIGURA 10: Mineralização da matriz, por vermelho de alizarina (μM), após 14 dias de cultivo dos osteoblastos na ausência de qualquer substrato (C) ou em contato com as superfícies Ticp, BGTi37 e BGTi600. Barras com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ($p > 5\%$) (ANOVA seguido por teste de Tukey).	53
FIGURA 11: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos osteoblastos cultivados por 7 dias sobre as três diferentes superfícies (Ticp, BGTi37 e BGTi600).	54
FIGURA 12: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos osteoblastos cultivados por 14 dias sobre as três diferentes superfícies (Ticp, BGTi37 e BGTi600).	55
FIGURA 13: Morfologia dos osteoblastos cultivados por 7 e 14 dias sobre as três diferentes superfícies (Ticp, BGTi37 e BGTi600) observada em microscopia eletrônica de varredura.	56

FIGURA 14: Parâmetros do osso cortical avaliados por microtomografia computadorizada dos grupos controle (Ticp) e teste (BGTi37) em dois diferentes períodos (14 e 28 dias). Barras com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ($p > 5\%$) (Teste T pareado para comparação entre Ticp e BGTi37 e Teste T não pareado para comparação intragrupos nos tempos 14 e 28 dias)..... 58

FIGURA 15: Parâmetros do osso medular avaliados por microtomografia computadorizada dos grupos controle (Ticp) e teste (BGTi37) em dois diferentes períodos (14 e 28 dias). Barras com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ($p > 5\%$) (Teste T pareado para comparação entre Ticp e BGTi37 e Teste T não pareado para comparação nos tempos 14 e 28 dias). 59

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASTM: *American Society for Testing and Materials*

BCIP-NBT: *5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate - nitrobluetetrazolium*

CDTN: Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

CEUA: Comissão de ética no uso de animais

CO₂: dióxido de carbono

HCl: ácido clorídrico

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

kG: quilograma

kGy: quilogray

LaMPaC: Laboratório de materiais e pilhas a combustível

MEM: *Minimum Essential Medium*

MEV: microscopia eletrônica de varredura

mg: miligrama

ml: mililitros

MTT: *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide*

nm: nanometro

PBS: tampão fosfato salino

rpm: rotação por minuto

Sa: rugosidade aritmética

SDS: sódio-dodecil-sulfato

SLU: superintendência de limpeza urbana

Sq: rugosidade quadrática média

TetCP: tetracálcio fosfato

Ti: Titânio

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

XPS: espectroscopia fotoeletrônica de raios X

α TCP: alfa tricálcio fosfato

µg: micrograma

µm: micrometro

µM: micromolar

LISTAS DE SÍMBOLOS

% : Por cento

⁰C : Graus Celsius

α : Alfa

Ca: Cálcio

P: Fósforo

kV: Quilovolt

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTAS DE ILUSTRAÇÕES	9
LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
LISTAS DE SÍMBOLOS	12
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. SUPERFÍCIE DE IMPLANTES	20
2.1.1. <i>Superfície de titânio revestida por deposição discreta de cristais de fosfato de cálcio (Nanotite®)</i>	20
2.1.2. <i>Estudos in vitro de superfície de implantes revestidas por fosfato de cálcio</i>	22
2.1.3. <i>Estudos in vivo de superfície de implantes revestidas por fosfato de cálcio</i>	28
3. OBJETIVO	33
3.1. GERAL	33
3.2. ESPECÍFICOS	33
4. METODOLOGIA	34
4.1. DESENVOLVIMENTO DAS SUPERFÍCIES EXPERIMENTAIS	34
4.2. AVALIAÇÃO DA TOPOGRAFIA SUPERFICIAL	35
4.3. ESTUDO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i>	36
4.3.1. <i>Extração e cultivo dos osteoblastos</i>	36
4.3.2. <i>Preparação das microplacas de cultura</i>	37
4.3.3. <i>Ensaio de viabilidade celular (MTT)</i>	38
4.3.4. <i>Ensaio de fosfatase alcalina</i>	39
4.3.5. <i>Ensaio de mineralização (vermelho de alizarina)</i>	40
4.3.6. <i>Avaliação da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura</i>	40
4.4. ESTUDO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	41
4.4.1. <i>Cálculo amostral</i>	41
4.4.2. <i>Preparação dos espécimes</i>	42
4.4.3. <i>Procedimento cirúrgico</i>	42
4.4.4. <i>Eutanásia</i>	46
4.4.5. <i>Análise por microtomografia computadorizada</i>	46
4.4.6. <i>Análise estatística</i>	48
5. RESULTADOS	49
5.1. AVALIAÇÃO DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL	49
5.2. ESTUDO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i>	50
5.2.1. <i>Ensaio de viabilidade celular (MTT)</i>	51
5.2.2. <i>Ensaio de produção de fosfatase alcalina</i>	51
5.2.3. <i>Ensaio de mineralização (vermelho de alizarina)</i>	52
5.2.4. <i>Avaliação da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura</i>	53

5.3. ESTUDO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	57
5.3.1. <i>Ossos cortical</i>	57
5.3.2. <i>Ossos medular</i>	59
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS E APÊNDICES	76
1. <i>Aprovação da comissão de ética no uso de animais</i>	76
ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O CURSO	77
<i>Captação de recursos em agências de fomento</i>	77
<i>Processo seletivo</i>	77
<i>Artigos completos publicados em periódicos</i>	77
<i>Artigos completos enviados para publicação em periódicos</i>	77
<i>Resumos publicados em anais de congressos</i>	77
<i>Resumos aceitos para apresentação e publicação em anais de congressos</i>	78
<i>Revisão de artigo</i>	78

1. INTRODUÇÃO

Implantes de titânio (Ti) são utilizados rotineiramente em cirurgias ortopédicas e odontológicas. Algumas características como seu excelente comportamento biológico, mecânico e sua resistência à corrosão sob condições fisiológicas justificam a escolha do titânio comercialmente puro ou suas ligas para essa finalidade. Sua biocompatibilidade e resposta favorável ao fenômeno da osseointegração também justificam a larga utilização em implantes dentários(1).

Atualmente, o mercado mundial de implantes é amplamente dominado pelas superfícies microtexturizadas de titânio e suas ligas, produzidas por jateamento seguido por erosão ácida. Esses implantes, quando instalados em locais com boa qualidade óssea, apresentam taxas de sucesso(2) e sobrevivência(3) acima de 95% em estudos longitudinais.

Como o titânio é um material biocompatível, sem capacidade de ligar-se quimicamente ao tecido ósseo e de gerar estímulos favoráveis rápidos(4), modificar a superfície dos implantes de titânio é desejável para melhorar suas propriedades osteoindutoras(5) e aumentar sua taxa de sucesso em situações clínicas mais desafiadoras como regiões de menor densidade óssea ou pacientes idosos com capacidade de cicatrização reduzida, devido à condições sistêmicas como diabetes e osteoporose(6).

Implantes com topografia e propriedades físico-químicas melhoradas proporcionam um ambiente adequado onde o potencial biológico natural para a regeneração óssea poderá ser estimulado e maximizado(7). Essa estratégia terapêutica pode reforçar e/ou acelerar o processo de osseointegração de implantes dentários para o seu carregamento imediato e aumentar a taxa de sucesso a longo prazo(8, 9).

O processo de osseointegração dos implantes pode ser dividido em três fases distintas. A primeira é a fase celular, caracterizada pela atração, diferenciação e proliferação de células osteoblásticas em contato com a superfície do implante e a produção da matriz óssea. Na segunda fase, ocorre a mineralização e por fim, na terceira fase, observa-se a remodelação óssea. Neste contexto, um importante aspecto deste processo de

osseointegração é a influência da superfície dos implantes na resposta celular(10).

Como a superfície do implante é a primeira parte a interagir com o hospedeiro, suas propriedades destacam-se como um dos mais importantes fatores para sua incorporação ao tecido ósseo(11). Dessa forma as superfícies dos implantes deveriam estimular a diferenciação osteogênica e a produção de matriz extracelular(10).

Dentre as modificações das superfícies dos implantes, destacam-se os recobrimentos bioativos contendo fosfato de cálcio, que são altamente biocompatíveis e possuem grande capacidade osteoindutora(5, 12-15).

Os recobrimentos bioativos contendo fosfato de cálcio apresentam capacidade osteoindutora e podem acelerar a osseointegração por dois mecanismos distintos. Sua presença, juntamente ou não com grupos funcionais como o SiOH dos vidros bioativos, pode facilitar a mineralização independente de células, resultando na formação de uma camada de apatita biológica semelhante a apatita óssea, favorecendo a sua incorporação ao tecido ósseo(16). Os revestimentos com conteúdo de fosfato de cálcio proporcionam sítios ativos de nucleação que facilitam o crescimento dos cristais na superfície do substrato, sendo essa característica um indicativo da capacidade bioativa *in vivo* do material (17).

Por outro lado, a presença do revestimento contendo fosfato de cálcio promoveria a estimulação química de células indiferenciadas por meio de receptores de detecção de cálcio, promovendo sua diferenciação, a deposição de matriz extracelular e sua mineralização(15).

O exato mecanismo de ativação celular pelo fosfato de cálcio ainda não foi totalmente esclarecido. Acredita-se que a baixa no potencial de hidrogênio (pH) induziria a dissociação iônica do fosfato de cálcio em Ca^{2+} e PO_4^{3-} . A presença dos íons Ca^{2+} parece favorecer a adsorção das proteínas extracelulares fibronectina e vitronectina, que estão envolvidas no mecanismo biológico de adesão e proliferação celular(18-21). Mesmo em baixos níveis de concentração esses íons induziram aumento na produção de fosfatase alcalina e na expressão gênica de osteocalcina em osteoblastos primários de ratos(22). A ativação plaquetária, a estabilização do coágulo, a adesão, proliferação e diferenciação de células osteoblásticas em contato

com uma superfície experimental de titânio modificada por íons Ca^{2+} foram maiores do que em uma superfície de titânio sem a presença desses íons(23, 24). Porém, sua influência depende do tipo e do estágio de diferenciação celular(25). A adesão celular à superfície do biomaterial se dá através das integrinas que são influenciadas pela adsorção das proteínas extracelulares(26).

O revestimento de fosfato de cálcio na forma de hidroxiapatita em uma liga de titânio (Ti-6Al-7Nb) resultou em maior capacidade de produção de matriz extracelular pelas células osteoblásticas primárias de ratos(27). Essas interações regulariam a expressão gênica dessas células e a qualidade da adesão influenciaria na sua morfologia e capacidade de proliferação e diferenciação(5, 26, 27).

Em estudo *in vitro* com células osteoblásticas primárias de ratos foi demonstrado que o revestimento contendo fosfato de cálcio foi capaz de alterar a atividade das células osteoblásticas, resultando em maior mineralização ao fim do experimento, quando comparada à superfície de titânio microtexturizada. Quando foi adicionado um peptídeo derivado do colágeno tipo I a esse mesmo revestimento, não se observou maior ativação celular ou mineralização quando comparado ao titânio revestido somente com fosfato de cálcio(13). Outros trabalhos *in vitro* também demonstraram que osteoblastos em contato com revestimentos contendo fosfato de cálcio apresentaram maior potencial de osteogênese(13, 22, 23, 27, 28).

Nos estudos experimentais em animais foram demonstrados, nos estágios iniciais de osseointegração, resultados melhores para os implantes de titânio com revestimento contendo fosfato de cálcio quando comparado aos não revestidos(23, 29-32).

Devido ao grande número de processos de produção e incorporação de revestimentos ao titânio, uma revisão sistemática sobre o revestimento com fosfato de cálcio restringiu-se a considerar os estudos experimentais em animais que avaliaram testes mecânicos de remoção dos implantes e a presença de tecido ósseo em contato com o implante, quando revestidos pelos seguintes métodos: deposição por laser pulsado, revestimento por pulverização, deposição assistida por feixe de íons, deposição por spray eletrostático e deposição biomimética. A maioria dos trabalhos demonstrou

maior quantidade de tecido ósseo em contato com suas superfícies revestidas quando comparado aos implantes não revestidos. Porém ainda não existe evidência definitiva do efeito desse revestimento na formação óssea em torno dos implantes dentários(6).

Metanálises de ensaios clínicos mostraram que os implantes com revestimento contendo fosfato de cálcio apresentaram maior porcentagem de formação óssea em contato com sua superfície quando comparados aos implantes não revestidos(6, 33).

Mistry *et al.* em um estudo clínico realizado em 2011, observaram que os implantes de uma liga de titânio (Ti6Al4V) revestidos por vidro bioativo (contendo sílica e óxidos de cálcio, sódio, fósforo, boro), apresentaram taxas de sucesso superiores aos jateados com hidroxiapatita quando instalados em osso de menor densidade(34). Em outro estudo clínico, os autores compararam os parâmetros clínicos e imaginológico de implantes convencionais de uma liga de titânio (Ti6Al4V), com implantes recobertos com hidroxiapatita ou com o mesmo vidro bioativo, instalados nas regiões anteriores da maxila e mandíbula. Foi observado que os implantes revestidos pelo vidro bioativo apresentaram resultados superiores aos convencionais e aos recobertos com hidroxiapatita quando instalados na região anterior da maxila. Na região anterior da mandíbula, os implantes apresentaram resultados semelhantes (35).

Os dados disponíveis na literatura científica apontam que os revestimentos contendo fosfato de cálcio melhoram a bioatividade dos implantes, porém, a ausência de padronização dos procedimentos e equipamentos para a produção desses revestimentos resulta em rugosidades e composições químicas variadas, interferindo diretamente nessa propriedade.

Dessa forma, o presente trabalho testou uma nova superfície experimental bioativa e nanoestruturada de titânio grau 4, revestida com vidro bioativo contendo fosfato de cálcio, com objetivo de gerar uma alternativa vantajosa, especialmente para regiões de menor densidade óssea ou pacientes idosos com capacidade de cicatrização reduzida devido a condições sistêmicas como diabetes e osteoporose. Os resultados dessa nova superfície foram comparados ao padrão ouro, uma superfície de titânio

microtexturizada, com sucesso clínico já consolidado na literatura atual. Diferentemente de vários outros métodos de produção desses revestimentos para as superfícies de titânio, onde altas temperaturas são necessárias, o processo de produção sol-gel do revestimento testado nesse estudo é mais simples e menos oneroso. Além disto, o processo de produção é realizado em temperatura ambiente, o que possibilitaria também carrear outras substâncias biofuncionais, tais como: agentes terapêuticos, bifosfonatos, vitaminas e agentes bactericidas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Superfície de implantes

A topografia e a composição química da superfície dos implantes são capazes de influenciar a proliferação, diferenciação, ativação e morfologia celulares, assim como a produção de matriz extracelular(36).

De acordo com Albrektsson e Wennerberg(37), os implantes dentários podem ser classificados de acordo com as seguintes diferentes categorias: liso (Rugosidade aritmética (Sa) < 0,5 μm), minimamente rugoso (Sa entre 0,5 – 1,0 μm), moderadamente rugoso (Sa entre 1,0 – 2,0 μm) e rugoso (Sa > 2,0 μm).

Wennerberg e Albrektsson(38) observaram que os implantes com superfícies moderadamente rugosas (Sa entre 1,0 – 2,0 μm) apresentaram melhor resposta do tecido ósseo do que os implantes mais lisos ou com rugosidades maiores.

O tratamento superficial com jateamento seguido por erosão ácida normalmente produz superfícies moderadamente rugosas quando realizado em ligas de titânio grau quatro(39). Esse tratamento aplicado à liga de Ti6Al4V normalmente resulta em menor rugosidade superficial devido à maior dureza dessa liga, produzindo superfícies consideradas lisas, como descrito por Rosa e colaboradores(36).

Atualmente, implantes de titânio com superfícies microtexturizadas produzidas por jateamento seguido por erosão ácida, predominam no mercado mundial de implantes e apresentam altas taxas de sobrevivência (98,8%)(3) e de sucesso (97%)(2) após período de acompanhamento de 10 anos.

2.1.1. Superfície de titânio revestida por deposição discreta de cristais de fosfato de cálcio (Nanotite[®])

Dentre as superfícies de implante de titânio revestidas por fosfato de cálcio comercialmente disponíveis, merece destaque a superfície Nanotite[®] (3i Implant Innovations, Palm Beach Gardens, Flórida, EUA). Descrita como uma superfície minimamente rugosa e revestida por deposição discreta de cristais de fosfato de cálcio, variando de 20 a 100 nm, depositados por meio do método sol-gel(6).

Um estudo experimental, publicado em 2009 por Mendes, Moineddin e Davies(40), demonstrou que após 9 dias de implantação dos parafusos em fêmures de ratos, a estabilidade mecânica, testada por um ensaio de tração, foi superior nos parafusos revestidos com fosfato de cálcio quando comparada à uma superfície de titânio minimamente rugosa, tratada por duplo ataque ácido.

Ainda em 2009, utilizando o mesmo modelo animal, os mesmos autores(41) testaram dois tipos de liga de titânio (comercialmente puro grau quatro e liga de Ti6Al4V) minimamente rugosos, revestidos ou não pela superfície de fosfato de cálcio (Nanotite[®]). Após 9 dias de implantação, a quantidade de tecido ósseo em contato com a superfície revestida foi significativamente maior comparada à não revestida. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos revestidos e não revestidos quando se alteraram as ligas testadas. A liga de Ti6Al4V revestida com o fosfato de cálcio apresentou a maior quantidade de tecido ósseo, enquanto a menor quantidade foi observada para o titânio comercialmente puro grau 4 não revestido.

Em outro estudo experimental, publicado em 2009 por Lin *et al.*(42), parafusos de titânio comercialmente puro grau 4 e liga de Ti6Al4V, com superfícies minimamente rugosas, obtidas por duplo ataque ácido, revestidas ou não pela superfície de fosfato de cálcio (Nanotite[®]), foram instalados nos fêmures de 48 ratos. As características topográficas dos grupos, analisadas utilizando-se interferômetro, demonstraram que as diferentes ligas utilizadas, titânio grau 4 ou liga de Ti6Al4V, não alteraram os parâmetros de rugosidade superficial avaliados. A estabilidade mecânica do grupo onde os parafusos foram revestidos por fosfato de cálcio (Nanotite[®]) foi significativamente maior do que nos grupo sem que os parafusos não foram revestidos (Osseotite[®]), após um período de 2 semanas. Essa diferença não foi observada na análise de superfície em contato com tecido ósseo na avaliação histomorfométrica, sendo os valores semelhantes para os grupos revestidos por fosfato de cálcio (Nanotite[®]) e não revestidos (Osseotite[®]).

Por outro lado, Abrahamsson *et al.*(43), em um estudo experimental em cachorros, observaram maior quantidade de tecido ósseo em contato com a superfície minimamente rugosa sem revestimento Osseotite[®] (3i Implant

Innovations, Palm Beach Gardens, Flóricia, EUA) quando comparada a revestida (Nanotite®), 2 e 4 semanas após a implantação. As dimensões e a composição do tecido mole perimplantar em contato com as duas superfícies testadas foram semelhantes. Os resultados sugerem que a deposição nanométrica dos cristais de fosfato de cálcio em uma superfície minimamente rugosa obtida por duplo ataque ácido não melhoraram a osseointegração nos períodos precoces de avaliação.

Avaliações clínicas em humanos das duas superfícies (Osseotite® e Nanotite®) foram apresentadas por Orsini *et al.*(44) e Goené *et al.*(45) no ano de 2007.

Orsini *et al.*(44) instalaram 15 implantes de 2 X 10 mm com superfície Nanotite® e 15 implantes com superfície Osseotite® em uma região de baixa densidade óssea (tuberosidade maxilar). Após 8 semanas de instalação, os implantes e os tecidos perimplantares adjacentes foram removidos com uma broca trefina. A porcentagem de tecido ósseo em contato com as superfícies foi significativamente maior para o grupo Nanotite® quando comparado ao Osseotite®, concluindo que a deposição nanométrica dos cristais de fosfato de cálcio aumentou a deposição de tecido ósseo em uma região de baixa densidade óssea.

Os resultados do ensaio clínico aleatório prospectivo apresentados por Goené *et al.*(45) também demonstraram maior quantidade de tecido ósseo em contato com implantes do grupo Nanotite® comparado ao Osseotite®, no período de avaliação de 8 a 12 semanas após a implantação, concluindo que a modificação da superfície pela deposição nanométrica dos cristais de fosfato de cálcio teve efeito positivo na formação de novo tecido ósseo em áreas com baixa densidade óssea.

2.1.2. Estudos *in vitro* de superfície de implantes revestidas por fosfato de cálcio

Massaro *et al.*(46) avaliaram o comportamento de osteoblastos humanos cultivados em contato com discos de titânio grau 2 puro ou revestidos com hidroxiapatita por meio de 3 diferentes métodos: spray de plasma, método sol-gel e de pulverização. Após 10 dias de cultivo, foi realizado o ensaio de viabilidade celular (MTT) e de atividade celular

(produção de fosfatase alcalina e osteocalcina). Análise por microscopia eletrônica de varredura também foi utilizada para avaliação da presença e da morfologia dos osteoblastos em contato com as diferentes superfícies. O ensaio de MTT mostrou boa viabilidade celular para todas as superfícies. O maior crescimento celular foi em contato com a superfície de Ti puro e recoberto por HA pelos métodos de plasma e sol-gel. Em relação à produção de fosfatase alcalina, osteoblastos cultivados sobre a superfície revestida pelo método sol gel apresentaram maior atividade em relação ao controle. As outras superfícies revestidas por hidroxiapatita (spray de plasma e pulverizada) apresentaram atividade semelhante ao Ti puro. A produção de osteocalcina foi maior em contato com as superfícies revestidas pelos métodos de pulverização e sol gel. A microscopia eletrônica de varredura mostrou células recobrando todas superfícies avaliadas e os osteoblastos presentes apresentavam morfologia plana e extensões citoplasmáticas fazendo a conexão intercelular.

Knabe *et al.* (47) avaliaram o comportamento de células da medula óssea de ratos cultivadas durante 14 dias em contato com quatro diferentes superfícies de titânio: liso (controle), microtexturizado por jateamento com óxido de alumínio e imersão em solução ácida, recoberto por plasma spray de titânio e recoberto por hidroxiapatita aplicada pelo spray de plasma. A maior densidade de células foi observada em contato com a superfície microtexturizada por jateamento com óxido de alumínio e imersão em solução ácida, seguida pela superfície recoberta por plasma spray de titânio. Já as células em contato com a superfície recoberta por hidroxiapatita aplicada pelo spray de plasma apresentaram um padrão de crescimento mais lento.

Em 2002, de Lavos-Valereto *et al.*(27)cultivaram células osteoblásticas primárias de ratos neonatos em contato com discos de uma liga de titânio (Ti6Al7Nb). Os 24 discos foram inicialmente lisos e polidos (grupo controle) e, posteriormente, metade deles foram revestidos com hidroxiapatita pela técnica de spray de plasma (grupo experimental). A viabilidade e a morfologia celular foram avaliadas nos dois grupos e comparadas à um terceiro grupo, onde as células proliferaram na ausência de qualquer substrato (controle absoluto). Nos períodos de 7 e 11 dias, a viabilidade celular dos osteoblastos

cultivados sobre discos de Ti revestidos com hidroxiapatita foi estatisticamente inferior ao do grupo controle absoluto. A viabilidade do grupo não revestido foi semelhante ao controle absoluto em todos os períodos testados. Na análise por microscopia eletrônica de varredura, independente do substrato, as células osteoblásticas apresentaram morfologia plana e poligonal, formando camadas confluentes. As células em contato com os discos lisos e polidos organizaram-se em várias camadas com pouca ou nenhuma matriz extracelular. As células em contato com os discos revestidos com hidroxiapatita apresentaram a mesma morfologia e organização em camadas, mas com maior quantidade de matriz extracelular, em sua maioria parecida com colágeno.

Ehara *et al.*(28) avaliaram *in vitro* a proliferação, diferenciação e mineralização de células imortalizadas de ratos em contato com alfa tricálcio fosfato (α TCP) e tetracálcio fosfato (TetCP), solubilizados no meio de cultura nas concentrações de 1 ou 10 μ M. A viabilidade celular, a atividade da fosfatase alcalina, bem como a expressão gênica do colágeno, osteocalcina e osteopontina foram testados nos períodos de 12 horas, 1, 3 e 7 dias de cultura. O número de células aumentou com o passar dos períodos de incubação em todos os grupos testados, sem diferença entre eles, sem influência da presença de α TCP e TetCP nas duas concentrações testadas. Da mesma forma, as expressões gênicas da osteocalcina e osteopontina não alteraram significativamente na presença das duas formas de fosfatos de cálcio comparadas ao controle. Por outro lado, nos períodos de avaliação mais precoces, a expressão gênica de colágeno e a atividade da fosfatase alcalina foram significativamente maiores nos grupos tratados com fosfatos de cálcio quando comparado ao controle, em especial no grupo de α TCP. O ensaio de vermelho de alizarina demonstrou que não houve mineralização do grupo controle durante todos os períodos de avaliação: 4, 7, 10 e 14 dias. Nos períodos de 7 e 10 dias, observou-se franca mineralização nos poços contendo α TCP e TetCp, com menor intensidade no último grupo quando comparado ao grupo com α TCP. Concluíram que α TCP e TetCP não influenciaram na proliferação dos osteoblastos, mas provocaram maior ativação celular, o que pode ser demonstrado pelo aumento na formação e

mineralização da matriz extracelular, podendo, portanto, estimular a osteogênese.

Em 2004, Feng *et al.*(18) avaliaram *in vitro* a adesão, a morfologia e a atividade da fosfatase alcalina de osteoblastos primários de coelhos após 24 horas de cultivo em contato com quatro diferentes superfícies de titânio: liso, com revestimento contendo íons cálcio (Ca) ou fósforo (P) e contendo hidroxiapatita. As análises de espectroscopia fotoeletrônica de raios x (XPS) confirmaram as diferenças químicas das 4 diferentes superfícies testadas. A menor quantidade de células aderidas foi observada em contato com a superfície de titânio liso, seguido pela superfície contendo íons P. O maior número de osteoblastos aderidos foi observado em contato com as superfícies contendo íons Ca e hidroxiapatita. A atividade da fosfatase alcalina esteve em conformidade com os resultados do número de células aderidas às diferentes superfícies de titânio. Os osteoblastos observados por microscopia eletrônica de varredura em contato com todas as superfícies apresentaram morfologia usual, com forma plana e alongada. Por fim, afirmaram que a quantidade e a atividade dos osteoblastos em contato com as superfícies contendo Cálcio foi maior do que nas superfícies contendo só Fósforo.

Knabe *et al.*(10) avaliaram o comportamento de células osteoblásticas humanas cultivadas em contato com quatro diferentes superfícies de titânio: liso (controle), microtexturizado por jateamento com óxido de alumínio e imersão em solução ácida, recoberta por plasma spray de titânio e recoberta por hidroxiapatita aplicada pelo spray de plasma. A expressão gênica de colágeno tipo I, fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, osteonectina e sialoproteínas ósseas foi avaliada nos diferentes períodos de cultura: 3, 7, 14 e 21 dias. A expressão dos marcadores osteogênicos foi mais intensa nos osteoblastos em contato com a superfície revestida por hidroxiapatita quando comparada às demais superfícies testadas. Os autores também demonstraram que a superfície microtexturizada por jateamento com óxido de alumínio e imersão em solução ácida induziu maior ativação e proliferação dos osteoblastos quando comparada a superfície recoberta por plasma spray de titânio.

Em 2013, Pereira *et al.*(13) testaram o efeito da funcionalização de uma superfície de titânio microtexturizado com o peptídeo do colágeno tipo I juntamente com uma camada de fosfato de cálcio. Células osteoblásticas primárias foram isoladas da calvária de ratos neonatos Wistar e cultivadas em contato com cinco diferentes superfícies de titânio: liso; microtexturizado por jateamento e ataque ácido; microtexturizado e revestido com fosfato de cálcio; microtexturizado, revestido com fosfato de cálcio e funcionalizado com peptídeo em baixa concentração; microtexturizado, revestido com fosfato de cálcio e funcionalizado com peptídeo em alta concentração. A análise por microscopia de força atômica demonstrou que o revestimento com fosfato de cálcio diminuiu a rugosidade em aproximadamente 50% quando comparado ao grupo microtexturizado. O ensaio de viabilidade (MTT) não mostrou nenhuma diferença significativa entre os grupos nos períodos de 1, 3 e 7 dias. A atividade da fosfatase alcalina avaliada no período de 10 dias foi significativamente maior para o grupo de titânio liso comparado aos demais. A mineralização, avaliada pelo ensaio de vermelho de alizarina, no período de 14 dias, demonstrou quantidade significativamente maior de mineral em contato com as superfícies revestidas quando comparado ao titânio liso e microtexturizado.

Gao *et al.*(48) revestiram uma superfície de titânio com fosfato de cálcio utilizando um laser e avaliaram o comportamento *in vitro* de células osteoblásticas primárias de ratos em contato com essa superfície, comparando-a ao titânio liso. A análise por difração de raios X demonstrou que a superfície produzida continha aproximadamente 95% de beta tricálcio fosfato e 5% de alfa tricálcio fosfato. O número de osteoblastos aderidos à superfície experimental foi significativamente maior quando comparados àqueles em contato com o titânio liso nos três períodos testados (30, 60 e 120 minutos). Da mesma forma, o ensaio de MTT revelou maior proliferação de osteoblastos aderidos à superfície experimental quando comparada ao titânio liso, nos períodos de 4 e 8 dias. A análise por microscopia eletrônica de varredura, nos períodos de 1, 4 e 8 dias, demonstrou aumento no número de células em contato com as duas superfícies nos períodos mais longos de cultura. A expressão gênica de integrina e da proteína morfogenética óssea 2

foram mais acentuadas nas células em contato com a superfície revestida quando comparado ao titânio liso nos períodos de 4 e 8 dias.

Anitua *et al.*(23) avaliaram *in vitro* os efeitos dos íons cálcio incorporados na superfície de implantes na formação óssea. Titânio grau 4 foi inicialmente submetido a tratamento superficial por subtração ácida para obtenção de uma superfície microtexturizada. Em seguida a deposição dos íons cálcio foi realizada utilizando-se metodologia previamente testada. Diferentemente da superfície de titânio não modificada, a espectroscopia de emissão atômica revelou a presença de íons cálcio sobre as superfícies modificadas. Células fetais humanas da linhagem osteoblástica foram cultivadas em meio de cultura apropriado por 7 dias, com temperatura e atmosfera controladas. Estas células foram então cultivadas em contato com os discos de Ti, modificados ou não pela adição de íons Ca, para posterior avaliação da adesão, proliferação e diferenciação celular. Como controle negativo foi utilizado disco de polietileno. A superfície modificada por íons Ca induziu adesão celular significativamente maior do que a não modificada após 3 horas. A maior proliferação foi observada no quarto dia de cultivo, sendo significativamente maior na superfície modificada por íons Ca. Para avaliação da diferenciação celular utilizou-se o marcador de atividade para osteopontina, avaliado nos dias 7, 15 e 21. A superfície modificada por íons Ca apresentou expressão significativamente maior desse marcador somente no 7º dia, quando comparada a superfície controle. Dessa forma concluíram que a superfície de Ti modificada por íons Ca estimulou a adesão, proliferação e diferenciação de células osteoblásticas.

Klymov *et al.*(15)utilizaram um método biomimético controlado para deposição de fina camada de fosfato de cálcio sobre uma superfície nanotexturizada, preservando a topografia inicial, afim de testar a hipótese de ação sinérgica da topografia de superfície e composição química na atividade, diferenciação e mineralização de células osteoblásticas imortalizadas cultivadas em meio alfa MEM suplementado sob condições controladas. A atividade da fosfatase alcalina foi mais influenciada pela topografia do que pela deposição do revestimento de fosfato de cálcio. A rugosidade aumentou significativamente a expressão de osteopontina nos períodos de 7 e 21 dias e a expressão de osteocalcina no período de 21 dias.

A concentração de cálcio na ausência de células foi significativamente maior (35 vezes mais) nos substratos recobertos com o fosfato de cálcio no período entre 7 e 14 dias. Na presença de células, essa concentração só aumentou a partir de 21 dias de cultura. A combinação da topografia rugosa e o revestimento com fosfato de cálcio resultou em concentração de cálcio significativamente maior no intervalo de 28 dias. O ensaio de vermelho de alizarina demonstrou que a rugosidade esteve relacionada a maiores valores de mineralização durante todos os períodos avaliados (21,28 e 35 dias). Já o revestimento com fosfato de cálcio contribuiu para maiores mineralizações somente no intervalo de 28 dias quando associado à rugosidade.

Strakowska *et al.*(14) testaram a utilização de uma camada de carbono sobre uma liga de titânio (Ti6Al4V) previamente à deposição de uma camada de hidroxiapatita. Células mesenquimais humanas indiferenciadas foram cultivadas em contato com discos de titânio dos 3 seguintes grupos: liga de Ti6Al4V sem revestimento, liga de Ti6Al4V revestida com uma camada de carbono e liga de Ti6Al4V revestida com uma camada de carbono e recoberta com hidroxiapatita. Os maiores níveis de atividade da fosfatase alcalina foram observados nas células cultivadas em contato com a superfície da liga de Ti6Al4V sem revestimento, seguido pela superfície da liga de Ti6Al4V revestidas.

2.1.3. Estudos *in vivo* de superfície de implantes revestidas por fosfato de cálcio

Kuroda *et al.*(49) avaliaram a estabilidade mecânica, a fração de volume ósseo (volume ósseo/volume total) e a porcentagem de tecido ósseo em contato com os implantes instalados no longo eixo dos fêmures direitos de 54 ratos. Metade dos implantes de liga de titânio (Ti6Al4V) eram moderadamente rugosos e a outra metade foi revestida por fosfato de cálcio (hidroxiapatita) pelo método biomimético. Os animais foram eutanasiados 1, 2 ou 4 semanas após a cirurgia (n=9 por grupo). Seis fêmures de cada grupo foram submetidos a análise por microtomografia computadorizada, para determinação da fração de volume ósseo (volume ósseo/volume total) e, em seguida, foi realizado o teste mecânico de remoção em uma máquina de ensaio universal para avaliar a estabilidade mecânica. Os outros 3 espécimes

de cada grupo foram preparados para análise histomorfométrica da porcentagem de tecido ósseo em contato com os implantes. Os autores não observaram diferenças estatisticamente significativas da fração de volume ósseo e da porcentagem de tecido ósseo em contato com os implantes dos grupos testados. Os implantes revestidos apresentaram estabilidade mecânica significativamente maior do que os implantes não revestidos com fosfato de cálcio, em especial nos períodos iniciais de avaliação.

Butz *et al.*(50) realizaram um trabalho com intuito de validar o uso da microtomografia computadorizada como método quantitativo de avaliação da interface osso e implante. Sete minimplantes de titânio microtexturizados e não revestidos (Osseotite[®]) foram instalados no fêmur direito de sete ratos, que foram eutanasiados após 14 dias. A fração da cortical óssea não apresentou variação na presença do implante. Já a fração de volume ósseo na região medular foi significativamente maior nas regiões mais próximas aos implantes do que nas regiões mais distantes. Os dados da análise por microtomografia computadorizada em diferentes regiões do osso cortical e do osso medular apresentaram forte correlação com os dados da análise histomorfométrica, suportando o uso da microtomografia computadorizada como método não destrutivo de avaliação óssea quantitativa na interface osso e implante.

Gabet *et al.*(51) instalaram 37 minimplantes de titânio microtexturizados em tíbias de ratas ovariectomizadas, utilizando ou não o hormônio paratireóideo em diferentes concentrações (5, 25 e 75 µg/kg/dia), e compararam com ratas não ovariectomizadas (controle). A densidade do volume ósseo, a espessura e o número de trabéculas na interface minimplante e tecido ósseo, avaliados por meio de microtomografia computadorizada, juntamente com a estabilidade mecânica, demonstraram que a administração do hormônio paratireóideo foi eficaz na estimulação da osseointegração em osso com baixa densidade.

Junker *et al.*(6) publicaram uma revisão sistemática dos estudos experimentais em animais que avaliaram testes mecânicos de remoção dos implantes revestidos por fosfato de cálcio e dados de tecido ósseo em contato com o implante, restringindo sua análise pelos seguintes métodos de revestimento: deposição por laser pulsado, revestimento por pulverização,

deposição assistida por feixe de íons, deposição por spray eletrostático e deposição biomimética. Os dois trabalhos que testaram as superfícies revestidas por fosfato de cálcio pelo método de deposição por laser pulsado demonstraram uma resposta favorável do tecido ósseo comparado aos não revestidos. Dos cinco trabalhos experimentais em animais que avaliaram superfícies revestidas pelo método de pulverização, somente um deles não apontou melhor resultado de osseointegração para as superfícies revestidas. Dos quatro estudos de superfícies revestidas pela deposição assistida por feixe de íons, dois apresentaram melhores resultados de osseointegração ou estabilidade mecânica das superfícies revestidas e os outros dois apresentaram resultados semelhantes às superfícies não revestidas. Os dois estudos experimentais em gambás que utilizaram o método de deposição por spray eletrostático demonstraram resultados de osseointegração melhores para os grupos revestidos quando comparado aos não revestidos. Os dois trabalhos experimentais que testaram superfícies revestidas pelo método de deposição biomimética relataram porcentagem de contato com o tecido ósseo semelhantes aos implantes não revestidos. Os autores concluíram que a maioria dos trabalhos demonstrou maior quantidade de tecido ósseo em contato com as superfícies revestidas quando comparado aos implantes não revestidos, porém ainda sem evidência definitiva desse efeito.

Jimbo *et al.*(32) avaliaram a rugosidade superficial, a expressão gênica e o torque de remoção de implantes microtexturizados de titânio grau 4, revestidos ou não com uma camada nanométrica de fosfato de cálcio. Trinta e seis implantes, metade revestido (grupo teste) e a outra metade não revestido (grupo controle), foram instalados nas tíbias de 18 coelhos, que foram eutanasiados após 14 ou 28 dias. A rugosidade foi semelhante para os dois grupos. A supressão da expressão gênica do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) no grupo teste demonstrou menor ativação da resposta inflamatória, favorecendo o aumento da expressão de fosfatase alcalina em contato com a superfície revestida por fosfato de cálcio, indicando maior atividade de formação óssea. No período de 14 dias, o torque de remoção do grupo teste foi estatisticamente superior ao do controle. No período de 28 dias os torques de remoção foram semelhantes. A combinação da avaliação da expressão gênica juntamente com a avaliação mecânica do torque de

remoção indicou que o revestimento de fosfato de cálcio melhorou a osseointegração.

Pyo *et al.*(52) avaliaram a osseointegração de 40 parafusos de uma liga de titânio (Ti6Al4V), medindo 1,2 X 3 mm, instalados nas tíbias de 20 ratas ovariectomizadas, simulando um osso osteoporótico. Os parafusos foram imersos em solução ácida e em sequência revestidos com uma camada de fosfato de cálcio pelo método biomimético. Em seguida foram divididos em 4 grupos de acordo com a concentração de zolendronato imobilizado sobre o revestimento inicial: 0, 8, 80 ou 800 µg/ml. Os animais foram eutanasiados após 8 semanas e metade das tíbias foram analisadas por microtomografia computadorizada e a outra metade por análise histomorfométrica. A análise por histomorfometria não demonstrou diferença significativa na quantidade de tecido ósseo em contato com implante dos diferentes grupos testados. A análise por microtomografia computadorizada demonstrou quantidade significativamente maior de tecido mineralizado ao redor dos implantes revestidos com fosfato de cálcio e zolendronato na concentração de 800 µg/ml.

Cuijpers *et al.*(53) avaliaram a osteogênese utilizando análise histológica tridimensional e microtomografia computadorizada em torno de parafusos de titânio, revestidos ou não por fosfato de cálcio, instalados no longo eixo dos fêmures de ratas Wistar. Quatro ratas foram ovariectomizadas e outras quatro compuseram o grupo controle. Oito parafusos de titânio microtexturizados e oito parafusos de titânio microtexturizados e revestidos com fosfato de cálcio foram instalados bilateralmente nos fêmures dos animais, constituindo-se assim quatro grupos experimentais (n=4). A eutanásia ocorreu após 8 semanas e a porcentagem de volume ósseo foi avaliada em 3 diferentes regiões ao redor dos parafusos: 0 – 250 µm, 250 – 500 µm e 500 – 750 µm. As ratas ovariectomizadas apresentaram menor porcentagem de volume ósseo comparadas às ratas não ovariectomizadas (grupo controle). O revestimento com fosfato de cálcio não resultou em maior porcentagem de volume ósseo em contato direto com os parafusos nas ratas com osteoporose e sem osteoporose.

Anitua *et al.*(24) também avaliaram *in vivo* os efeitos dos íons cálcio incorporados na superfície microtexturizada de implantes de titânio grau 4.

Dezesseis implantes, 8 de superfície não modificada e 8 de superfície modificada pela incorporação de íons Ca, foram instalados nas tíbias de duas ovelhas adultas. Os animais foram sacrificados após 12 semanas e as tíbias dissecadas e preparadas para análise por microtomografia computadorizada e histomorfometria. A análise dos parâmetros de microtomografia computadorizada avaliados (volume ósseo, superfície óssea e suas densidades) demonstrou que a superfície modificada pelo íon Ca apresentou resultados estatisticamente melhores do que a superfície controle. A comparação do parâmetro tecido ósseo em contato com o implante, avaliado no exame histomorfométrico, apontou valor significativamente maior no grupo modificado pelo íon Ca, evidenciando maior osseointegração para essa superfície.

3. OBJETIVO

3.1. Geral

Comparar uma nova superfície bioativa e nanoestruturada de titânio grau 4 revestida com vidro bioativo com uma superfície de titânio grau 4 microtexturizada.

3.2. Específicos

- Avaliar e comparar a rugosidade superficial da nova superfície bioativa e nanoestruturada de titânio grau 4, revestida com vidro bioativo, e a superfície de titânio grau 4 microtexturizada por microscopia de força atômica;

- Avaliar e comparar *in vitro* a viabilidade, produção de fosfatase alcalina, a mineralização da matriz extracelular, bem como a morfologia dos osteoblastos primários de ratos em contato com a nova superfície bioativa e nanoestruturada de titânio grau 4, revestida com vidro bioativo, e a superfície de titânio grau 4 microtexturizada por meio dos ensaios celulares de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide), fosfatase alcalina, vermelho de alizarina e microscopia eletrônica de varredura;

- Avaliar e comparar *in vivo* a fração de volume ósseo, número, espessura e separação das trabéculas ósseas, área total dentro do periósteo, área da cortical óssea, fração da área cortical, espessura média da cortical em contato com a nova superfície de titânio grau 4 revestida com vidro bioativo e a superfície de titânio grau 4 microtexturizada por microtomografia computadorizada.

4. METODOLOGIA

4.1. Desenvolvimento das superfícies experimentais

Oitenta e um discos de uma liga de titânio grau 4, medindo 4mm de diâmetro por 2mm de altura, foram preparados pela empresa PecLab (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). Uma das superfícies planas desses discos foi submetida ao tratamento comercialmente utilizado pela empresa para produção de uma superfície de titânio grau 4 microtexturizada. O processo é segredo comercial da empresa e inclui o jateamento das peças com alumina e erosão ácida com solução de ácido nítrico e ácido fluorídrico, seguindo a norma ASTM B600 (*American Society for Testing and Materials*).

O restante dos processos de desenvolvimento das superfícies experimentais de titânio grau 4 revestidos com vidro bioativo foram realizados em parceria com o laboratório de materiais e pilhas a combustível (LaMPaC) do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Todos os espécimes foram lavados igualmente sob agitação com água destilada por dez vezes para a remoção de resíduos e, em seguida, lavados cinco vezes com acetona.

Vinte e sete espécimes foram separados e constituíram o grupo controle denominado titânio microtexturizado (Ticp).

Posteriormente, a solução sol-gel do vidro bioativo foi preparada. O sistema $(\text{SiO}_2)_{0,80}(\text{P}_2\text{O}_5)_{0,04}(\text{CaO})_{0,16}$ foi sintetizado pela hidrólise do tetraetilortossilicato (TEOS), e trifenilfosfato (PACK) e do $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, catalisada por ácido, a uma temperatura entre 24 e 26°C e com umidade relativa inferior a 59%. Para formação do vidro bioativo, foram adicionados a uma solução alcoólica, catalisado por ácido (pH 1,5), o TEOS, o PACK, o $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, em intervalos de quinze minutos, sob constante agitação. Após a completa solubilização do sal hidratado, a solução foi agitada por mais dez minutos(54).

O recobrimento dos demais 54 espécimes foi obtido pela imersão nessa solução. Utilizou-se o equipamento DIP-MMLQ, do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), com ângulo de imersão e retirada de 90 graus e velocidade de remoção de $1,05 (\pm 0,02) \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$. Após

o processo de imersão, as peças foram expostas ao ar por 30 minutos, em ambiente com temperatura de 30⁰C. Posteriormente, os 54 espécimes foram divididos em dois grupos com diferentes tratamentos térmicos. O primeiro grupo (BGTi37) foi seco a vácuo, à 37⁰C, por 10 dias. O segundo grupo (BGTi600) foi aquecido a 600⁰C por 5 horas. Ao final desse processo (FIG. 1), foram obtidos 27 espécimes para cada um dos 2 grupos experimentais: liga de titânio grau 4 revestida com vidro bioativo contendo fosfato de cálcio e seco à 37⁰C (BGTi37) e liga de titânio grau 4 revestida com vidro bioativo contendo fosfato de cálcio e seco à 600⁰C (BGTi600).

Dos 27 espécimes de cada grupo, 3 foram utilizados para avaliação da topografia superficial, 18 para os ensaios celulares de viabilidade celular, produção de fosfatase alcalina e mineralização e os 6 restantes para avaliação da morfologia celular.

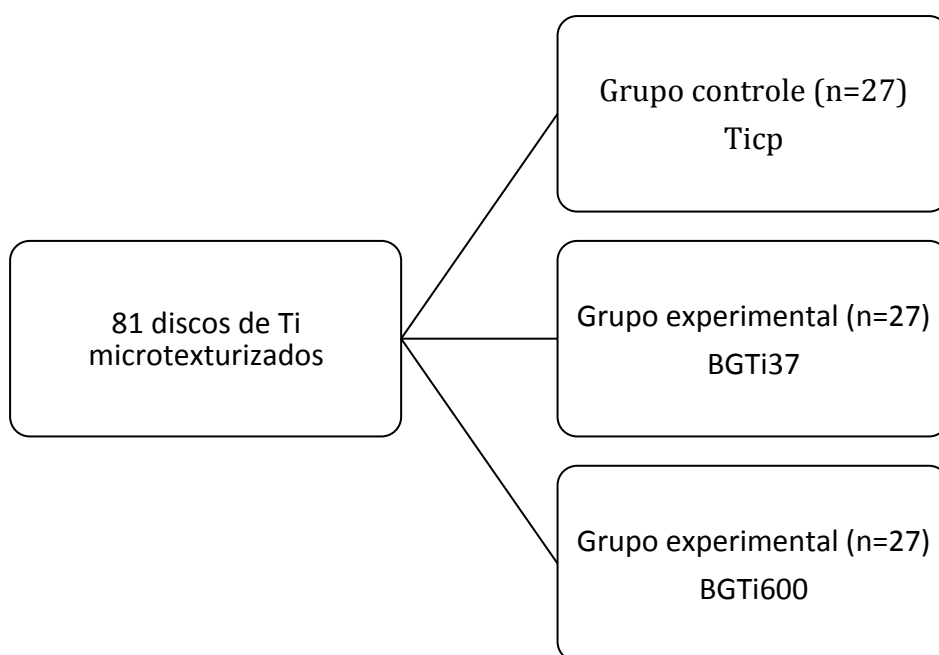


FIGURA 1: Divisão e número dos espécimes nos grupos controle e experimentais.

4.2. Avaliação da topografia superficial

Após a conclusão das etapas de produção química das superfícies experimentais, foi realizada a avaliação e caracterização química das superfícies(55). A topografia superficial do grupo controle e dos dois grupos experimentais foi analisada em triplicata por microscopia de força atômica. Utilizou-se o microscópio MFP-3D-SA (*Asylum Research*, Santa Bárbara,

Califórnia, EUA) com sonda AC160TS-R3 [$k = 26$ (11-54)N/m ($k =$ constante elástica), frequência de ressonância de 300 (200 - 400) kHz e o modo de análise “*tapping*”, disponível no Centro de Microscopia da UFMG. Após a inspeção de toda a superfície do disco e considerando a homogeneidade dos revestimentos, duas imagens de $100\mu\text{m}^2$ cada, foram obtidas de cada espécime. Após a obtenção das imagens, sua rugosidade foi aferida, sem qualquer correção ou manipulação, utilizando-se o programa AR 14.16.136 (*Asylum Research*, Santa Bárbara, Califórnia, EUA).

Os parâmetros utilizados para avaliação da rugosidade foram a rugosidade quadrática média (S_q) e a rugosidade aritmética (S_a)(56).

4.3. Estudo experimental *in vitro*

O comportamento biológico perante às superfícies de titânio dos três grupos foi testado através de estudo experimental *in vitro*, realizado em parceria com o Laboratório de Biologia Cardíaca do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais. Esse estudo foi submetido e aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 350/2013) (ANEXO 1).

4.3.1. Extração e cultivo dos osteoblastos

As células osteoblásticas primárias cultivadas foram extraídas de calvária de ratos Wistar neonatos entre dois e quatro dias de vida. A extração e cultivo dos osteoblastos foram adaptadas a partir de Orriss, Taylor e Arnett resumida abaixo(57).

Seis ratos neonatos foram eutanasiados por sobredose anestésica com uma solução de quetamina 10% (Rhobifarma, Hortolândia, São Paulo, Brasil) e xilazina 2% (Rhobifarma, Hortolândia, São Paulo, Brasil), na proporção de 1:1(0,1mL/100g de peso corporal), e decapitados para facilitar a dissecação e obtenção das calvárias.

As calvárias dissecadas foram então lavadas 3 vezes em tampão fosfato salino(PBS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), pH 7,4 com gentamicina a 1% (Gibco, Carlsbad, Califórnia, EUA), denominada solução 1, à 4°C . Ao longo da passagem por estes três banhos na solução 1, as calvárias foram higienizadas com lenços de papel sem fiapos *Kimwipes* (Kimberly-Clark, Roswell, Novo México, EUA) devidamente esterilizados, com

o objetivo de retirar o excesso de sangue e tecido fibroso, o que reduz a possibilidade de contaminação da cultura por outros tipos celulares, como fibroblastos e hemácias. Em seguida, as calvárias foram levadas para a cabine de fluxo laminar (BioSeg 12, Vecoflow Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e lavadas em mais 3 banhos e uma solução denominada 2, que contem PBS acrescido de 10% de meio alfa *Minimum Essential Medium* (α -MEM) (Gibco, Carlsbad, Califórnia, EUA) e 1% de gentamicina. No banho segundo banho na solução 2, as calvárias foram dobradas ao meio e suas porções centrais, próximas à sutura sagital, removidas utilizando-se tesoura estéril. Esse procedimento teve como objetivo diminuir a quantidade de fibroblastos na cultura celular.

Os fragmentos foram então colocados em tubo falcon contendo 30ml de tripsina (Gibco, Carlsbad, Califórnia, EUA) e 30mg de colagenase II (Gibco, Carlsbad, Califórnia, EUA) diluída em tripsina na concentração de 0,25% (Gibco, Carlsbad, Califórnia, EUA) para extração celular por meio de digestão enzimática à 37^oC. As células extraídas foram finalmente incubadas em meio α -MEM completo suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Carlsbad, Califórnia, EUA), 100 μ g/ml de gentamicina, 1% de antimicótico e de solução de ácido ascórbico (5 μ g/ml) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e betaglicerofosfato (2,16 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) à 37^oC, em estufa (Heal Force 160W, Heal Force Bio-Meditech Holdings Limited, Xangai, China) com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

As culturas foram monitoradas diariamente em microscópio óptico invertido (MoticAE31, Ted Pella Incorporation, Redding, California, EUA). Após 3 dias, a confluência celular entre 70 e 80% já podia ser observada. As culturas foram então expandidas utilizando tripsina a 0,25%. Após atingirem novamente a confluência, o processo de expansão foi repetido até a terceira passagem.

4.3.2.Preparação das microplacas de cultura

Os discos de titânio dos grupos Ticp, BGTi37 e BGTi600 foram distribuídos em sextuplicatas nas microplacas de 96 poços, para os

experimentos de viabilidade (MTT) e atividade celular (produção de fosfatase alcalina e vermelho de alizarina).

Nas microplacas dos ensaios de fosfatase alcalina e vermelho de alizarina, três espécimes adicionais foram tratados e preparados para microscopia eletrônica de varredura (MEV) após os respectivos tempos de cultura: 7 e 14 dias. Durante a inserção dos espécimes dentro dos poços, a superfície plana, submetida aos tratamentos controle e experimentais, foi sempre posicionada para cima. Previamente ao plaqueamento celular, os discos de titânio, posicionados nos seus respectivos poços experimentais, foram esterilizados dentro da microplaca.

Dessa forma, as microplacas de cultura foram acondicionadas individualmente em papel grau cirúrgico e seladas hermeticamente. As embalagens foram então esterilizadas por irradiação gama, com dose de 15 quilogray (kGy). Utilizou-se o equipamento irradiador panorâmico multipropósito de categoria II, (Nordion Inc., Ottawa, Ontario, Canadá), Modelo/número de série IR-214 e tipo GB-127, equipado com uma fonte de Cobalto-60, do Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN).

Em todos os experimentos, os osteoblastos foram plaqueados na densidade de $3,0 \times 10^3$ células/poço, diretamente sobre o poço (controle absoluto, ou seja, na ausência de qualquer material) ou sobre as superfícies tratadas dos discos de titânio (n=6/grupo) e cultivados por 7 ou 14 dias, dependendo do ensaio. Após o plaqueamento, as microplacas foram incubadas em estufa à 37°C com atmosfera úmida com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado à cada 2 dias.

4.3.3. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

O ensaio de viabilidade celular utilizando-se MTT (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) foi realizado após 7 dias de cultivo celular. O MTT foi preparado na concentração de 10 mg/mL, segundo Mosman(58) e descrita a seguir.

Essa solução de MTT foi diluída em meio de cultura completo (concentração final de 10% de MTT). O meio de cultura dos poços foi removido com auxílio de uma pipeta e os poços foram lavados com

solução de PBS. Em seguida, essa solução de PBS foi removida e acrescentada 200µL de solução de MTT 10% por poço. A placa de cultura foi incubada na estufa de CO₂ à 37°C por 4 horas. As células foram observadas ao microscópio óptico para visualização dos cristais de formazan. Após a incubação, a solução de MTT foi removida e os poços lavados mais uma vez em PBS. Em seguida, em cada poço foi acrescentado 200µL da solução de isopropanol (99%) e ácido clorídrico (HCl) puro e a placa agitada por 10 minutos em temperatura ambiente para solubilização dos cristais. Após agitação, a solução foi homogeneizada com pipeta e transferida para placa de leitura com fundo plano. Em seguida, a leitura foi realizada no espectrofotômetro (Biotek, uQuant, Winooski, Vermont, EUA) no comprimento de onda de 595 nanômetros (nm). Durante o ensaio de MTT, todos os passos envolvendo os reagentes foram executados em condições de mínima luminosidade.

4.3.4. Ensaio de fosfatase alcalina

Após sete dias de cultura, a produção da fosfatase alcalina foi analisada pelo ensaio de *5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate-nitrobluetetrazolium* (BCIP-NBT) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) conforme previamente descrito(59). Durante o experimento, todos os passos envolvendo esses reagentes foram executados em condições de mínima luminosidade. O meio de cultura foi removido e descartado. Em seguida, os poços foram lavados com PBS por duas vezes. Cem microlitros de solução de BCIP-NBT e PBS, na proporção de 1 (BCIP) : 1 (NBT): 8 (PBS), foram acrescentados aos poços contendo os osteoblastos. As placas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por duas horas. Após essas duas horas observou-se, em microscópio óptico invertido (Motic, modelo AE31), a formação dos precipitados de cor púrpura. Em seguida, a solução BCIP-NBT foi retirada sendo adicionados 100 µL de solução aquosa de sódio-dodecil-sulfato (SDS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), na concentração de 10%, e HCl na concentração de 0,3% por poço, para a solubilização dos precipitados de cor púrpura. Em seguida, as placas foram novamente incubadas em estufa à 37°C e 5% CO₂ *overnight*. Após incubação, transferiu-se 100 µL da solução contida em cada poço para uma nova placa de cultura

de fundo plano. Essa placa de fundo plano foi utilizada para medir a densidade óptica dessa solução no espectrofotômetro (Biotek, uQuant) no comprimento de onda de 595 nanômetros.

4.3.5. Ensaio de mineralização (vermelho de alizarina)

Para o ensaio de mineralização com vermelho de alizarina, o protocolo utilizado foi o proposto por Lin *et al.* (60). Após quatorze dias de cultura, os poços foram lavados cuidadosamente com solução de PBS, pH 7,4. Em seguida, as células foram fixadas com solução de etanol a 70% por 1h em geladeira. Após a remoção do fixador, os poços foram lavados com água destilada. Cento e setenta microlitros da solução do corante vermelho de alizarina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), na concentração de 40mM, pH 4,2, foram acrescentados em cada poço e mantidos sob agitação por 20 minutos. Posteriormente, o corante foi removido e os poços foram lavados novamente em água destilada até que o sobrenadante estivesse transparente. Subsequentemente, 110µL de cloreto de cetilpiridínio a 10% foram acrescentados nos poços, que foram mantidos sob agitação por 30 minutos. Após o período de agitação, transferiu-se 100µL de cada poço para uma nova placa de cultura de fundo plano e a densidade óptica foi mensurada no espectrofotômetro (Biotek, uQuant) no comprimento de onda de 550 nm. Em seguida, a leitura foi realizada comparando-se a coloração de cada poço com a curva padrão do corante, sendo que o ponto mais concentrado foi de 4000 µM e as concentrações seguintes obtidas pelas diluições seriadas de 2 vezes.

4.3.6. Avaliação da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura

Os 3 espécimes adicionais de titânio de cada um dos grupos foram preparados para serem analisados por microscopia eletrônica de varredura após 7 e 14 dias de cultura. Antes da fixação inicial, o meio de cultura foi removido e descartado. Em seguida, cada um dos poços contendo os espécimes foi lavado por duas vezes com 150 µL de tampão fosfato a 0,1 M. Na sequência, foram acrescentados, em cada um dos poços, 150 µL de solução fixadora de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato à 0,1 M. Os

espécimes foram mantidos em contato com a solução fixadora por 24h, à 4°C. Após esse período, a solução fixadora foi removida e descartada, e acrescentaram-se 150 µL de tampão fosfato à 0,1 M. As etapas seguintes de processamento das amostras (fixação secundária com tetróxido de ósmio, desidratação, secagem em ponto crítico de CO₂, montagem em *stubs*) foram realizadas no Centro de Microscopia da UFMG. Como os espécimes são de metal condutor e a camada de vidro bioativo apresentou espessura muito pequena (menor do que 400 nm), não foi necessário sua metalização para realizar essa análise. Os espécimes foram avaliados no Centro de Microscopia da UFMG utilizando-se o microscópio eletrônico de varredura FEG - Quanta 200 (FEI, Hillsboro, Oregon, EUA), em alto vácuo e com voltagem de 15 kV (quilovolt).

4.4. Estudo experimental *in vivo*

O comportamento biológico das superfícies de titânio, revestidas ou não com vidro bioativo, foi também testado em estudo experimental *in vivo* em parceria com o Laboratório de Biologia Cardíaca do ICB da Universidade Federal de Minas Gerais. Esse estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 350/2013) (ANEXO 1). Frente aos resultados do estudo *in vitro*, selecionou-se a superfície BGTi37 para os testes *in vivo* comparado ao grupo controle (Ticp).

4.4.1. Cálculo amostral

A partir dos dados da literatura(61), foi realizado o cálculo amostral do número de espécimes necessários para cada grupo, utilizando-se a seguinte fórmula, conforme previamente descrito (62):

$$n = S^2/\delta^2 (t_{\alpha(2),v} + t_{\beta(2),v})^2$$

$$n = 1,2769/(1,8668)^2 (t_{0,05(2),5} + t_{0,10(2),5})^2$$

$$n = 1,2769/(1,8668)^2 (2,571 + 1,476)^2$$

$$n = 1,2769/3,4849 (4,047)^2$$

$$n = 0,3664 \times 16,3782$$

$$n = 6,0009$$

Para compensar possíveis perdas, foram instalados 7 parafusos para cada grupo, nos dois momentos de avaliação: 14 e 28 dias. Desta forma, foram utilizados 14 animais para instalação de 28 parafusos, metade deles controle (Ticp) e outra experimental (BGTi37). Para minimizar o número de animais e garantir o número de espécimes necessários para cada grupo, optou-se por instalar dois parafusos por animal, sendo um parafuso do grupo experimental (BGTi37) e o outro do grupo controle (Ticp), selecionado aleatoriamente, em cada uma das tíbias, direita ou esquerda.

4.4.2.Preparação dos espécimes

Vinte e oito parafusos de uma liga de titânio grau 4 para enxerto ósseo da empresa PecLab, de diâmetro 1,5mm e comprimento 3mm, foram preparados pela própria empresa para o experimento. Esses parafusos foram submetidos ao tratamento comercialmente utilizado pela empresa para produção de uma superfície de titânio microtexturizada, utilizando-se jateamento com alumina e erosão ácida com ácido nítrico e fluorídrico, segundo a norma ASTM B600.

Em seguida, em parceria com o laboratório LaMPaC do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG, metade dos espécimes foram recobertos com o revestimento de vidro bioativo. O processo de recobrimento dos espécimes experimentais (BGTi37) foi idêntico ao realizado no experimento *in vitro*.

Os parafusos dos grupos controle (Ticp) e do experimental (BGTi37) foram embalados individualmente em papel grau cirúrgico e selados hermeticamente. As embalagens foram então esterilizadas com uma dose 15 kGy no Laboratório de Irradiação Gama do CDTN, assim como nos testes *in vitro*.

4.4.3.Procedimento cirúrgico

Foram utilizados ratos Wistar, com idade aproximada de 2 meses e peso entre 164 e 256 gramas. Os parafusos experimentais e controle foram instalados nas tíbias dos animais que foram eutanasiados nos dois momentos de avaliação: 14 e 28 dias, conforme previamente descrito(63).

Os ratos foram anestesiados com uma solução de quetamina 10% e xilazina 2% (1:1, 0,1 mL/100g de peso corporal, i.m.). Em seguida, foi

realizada a tricotomia das patas traseiras dos animais (FIG. 2A). Uma vez anestesiados e tricotomizados, os ratos foram colocados em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica e um campo cirúrgico autoclavado foi utilizado para isolar a pata a ser operada (FIG. 2 B). Em seguida a assepsia da pata foi realizada com solução de iodo (FIG. 2 C). Foi realizada incisão na porção ântero-lateral da tíbia utilizando-se lâmina de bisturi 15c (Solidor, Diadema, São Paulo, Brasil) (FIG. 2 D). A musculatura foi afastada utilizando-se bisturi de Orban e mantida afastada da superfície óssea com um descolador de Molt (FIG. 2 E). Para preparo do leito utilizou-se uma broca helicoidal de 1,3mm de diâmetro (Neodent, Curitiba, Paraná, Brasil), acoplada a um contra ângulo com redução de 20:1 (Kavo, Joinville, Santa Catarina, Brasil) sob rotação controlada de 1000 rpm em um motor elétrico (BLM600, Driller, Carapicuíba, São Paulo, Brasil), (FIG. 2 F) sob constante irrigação com solução salina resfriada (FIG. 3A). Os parafusos auto-rosqueantes de titânio dos grupos teste (BGTi37) ou controle (Ticp) foram inseridos na perfuração preparada (FIG. 3 B) usando uma chave manual (PecLab, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) (FIG. 3 C), alcançando estabilidade primária (FIG. 3 D). A musculatura foi então reposicionada (FIG. 3E) e a sutura realizada com um fio de nylon 4.0 (Biosut, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), e a área foi novamente limpa com solução de iodo (FIG. 3 F). Como protocolo, o primeiro parafuso foi sempre instalado na pata esquerda. A colocação do outro parafuso foi realizada imediatamente após o primeiro, seguindo o mesmo protocolo cirúrgico.

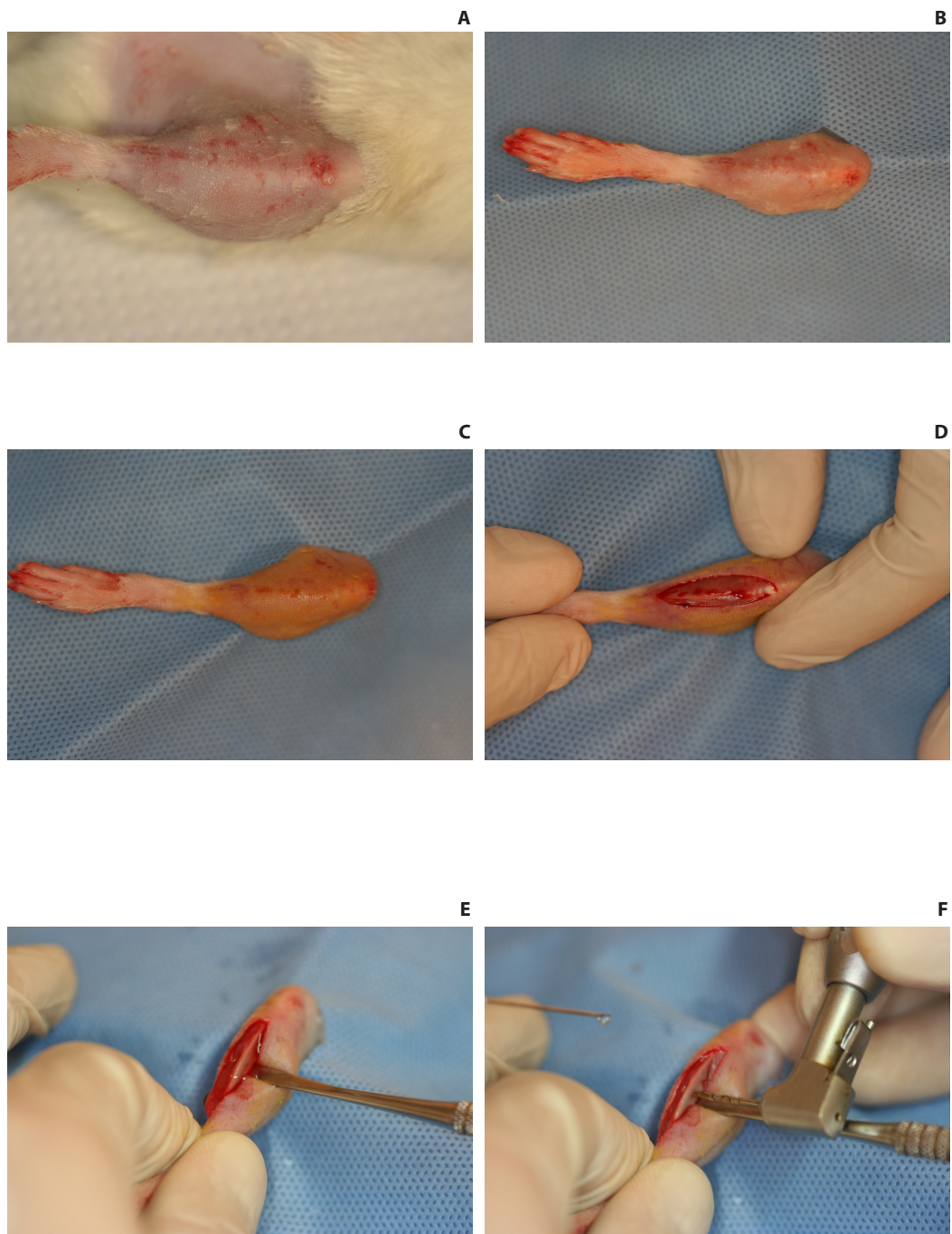


FIGURA 2: Imagens ilustrativas do procedimento cirúrgico para instalação dos parafusos controle e experimental nas tíbias dos ratos. A – Patas traseiras após tricotomia; B – colocação do campo cirúrgico; C – assepsia da pata com solução de iodo; D – incisão na porção ântero-lateral da tíbia; E – descolamento e afastamento do retalho; F – perfuração com broca helicoidal.

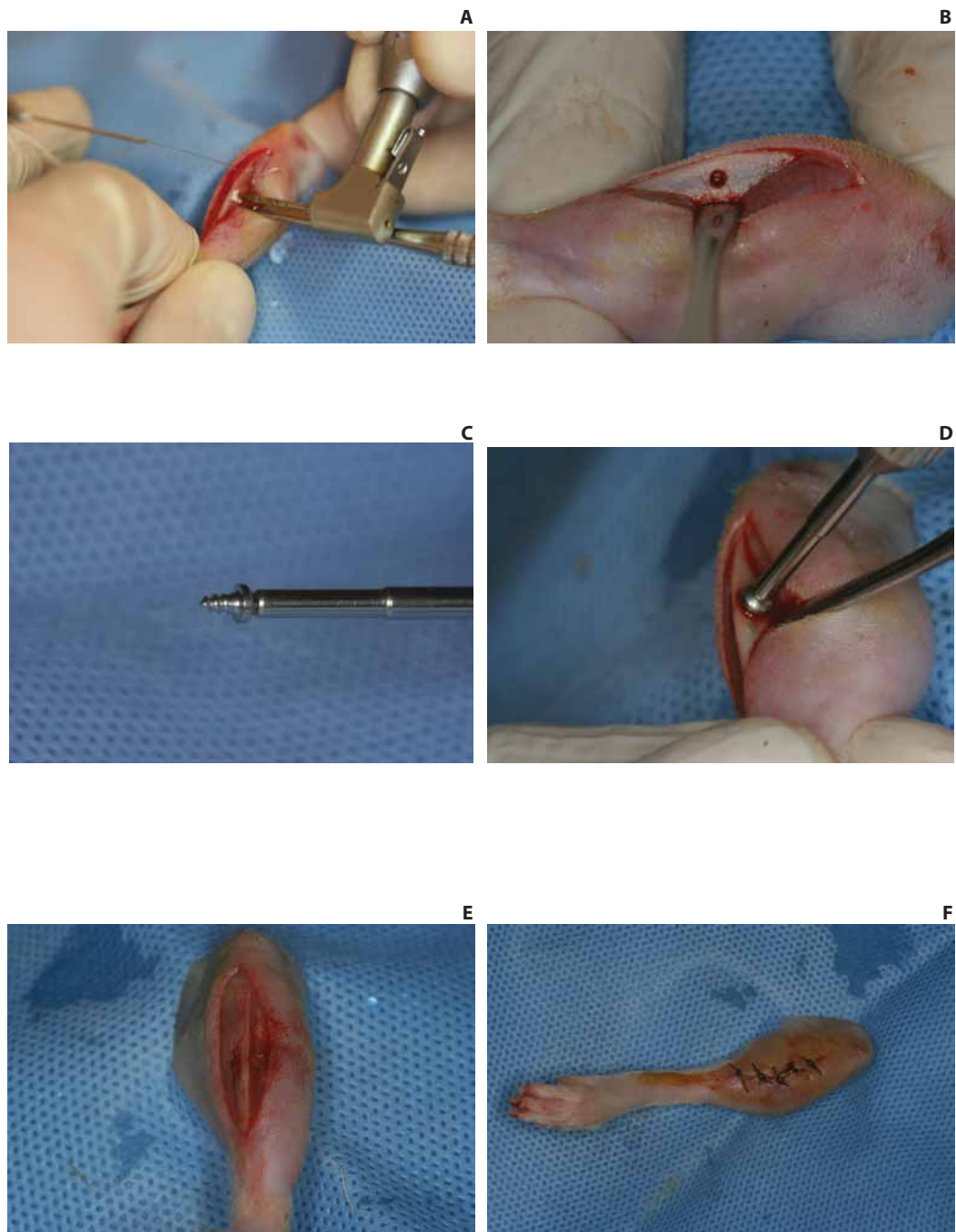


FIGURA 3: Imagens ilustrativas do procedimento cirúrgico para instalação dos parafusos controle e experimental nas tíbias dos ratos. A – perfuração sob irrigação com solução salina resfriada; B – perfuração finalizada; C – parafuso acoplado a chave manual de inserção; D – instalação do parafuso até alcançar estabilidade primária; E – reposicionamento da musculatura; F – retalho suturado após nova assepsia com solução de iodo.

Ao final do procedimento cirúrgico, os animais receberam uma dose via intramuscular do multibiótico (benzilpenicilina e estreptomicina – 1mg/kg) (Vitalfarma, São Sebastião do Paraíso, Minas Gerais, Brasil) e uma dose de analgésico (Banamine – 1mg/kg) (Intervet, Cruzeiro, São Paulo, Brasil), aplicada nas patas traseiras aleatoriamente. Um spray bactericida de uso veterinário (Bactrovet Prata -Sulfadiazina Prata, König Brasil, Maringá, São Paulo, Brasil) foi aplicado sobre a ferida cirúrgica para evitar qualquer contaminação.

Os animais foram acondicionados em número de 3 por caixa em ambiente adequado, com luminosidade e temperatura controladas, e com acesso *ad libitum* à água e ração para animais de laboratório.

4.4.4.Eutanásia

Após 14 dias da cirurgia, 7 animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina após sedação anestésica. Os outros 7 animais foram sacrificados após 28 dias da cirurgia.

Após a eutanásia, as tíbias de cada animal foram dissecadas e os tecidos moles totalmente removidos. As carcaças/dejetos foram colocados em sacos plásticos brancos devidamente identificados, mantidos congelados em freezer próprio e recolhidos por empresa especializada contratada pela UFMG.

As tíbias dissecadas foram então armazenadas individualmente em tubos falcon com 30 ml de formalina neutra a 10%, em pH 6,84, para fixação durante 48 horas. Após esse período, as tíbias foram lavadas por 3 vezes em água e, em seguida, armazenadas em álcool 70%.

4.4.5.Análise por microtomografia computadorizada

As tíbias foram escaneadas no Laboratório de Microtomografia do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - Campus de Araraquara, envoltas em papel toalha umedecido com água destilada, utilizando o aparelho SkyScan 1176 (BrukermicroCT, Kontich, Bélgica), ajustado na potência 80 kV, corrente de

300 μ A e tempo de exposição de 500 ms. As imagens apresentaram definição de 17,48 pixels com tamanho voxel de 12,45 μm^3 . As imagens tridimensionais (FIG. 4) foram reconstruídas pelo *software* NRecon, versão 1.6.10.4, sendo aplicado o filtro de cobre e alumínio (FIG. 5) e, em seguida, analisadas com o programa *CT Analyser* 1.13. O volume de interesse selecionado foi baseado no método de contorno de Buxsein *et al.*(64) para delinear o osso trabeculado adjacente ao implante utilizando uma área anatômica irregular desenhada manualmente alguns milímetros de distância do osso cortical.



FIGURA 4: Imagem tridimensional do parafuso instalado na tíbia.

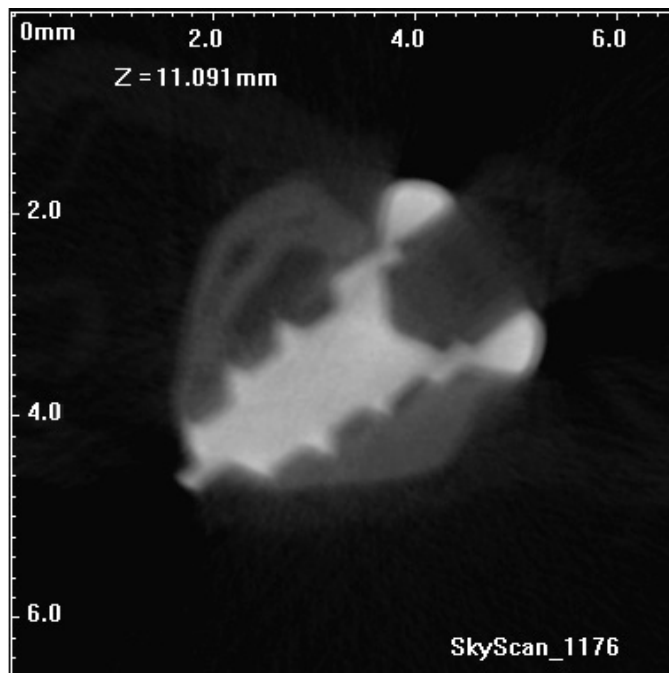


FIGURA 5: Imagem após a reconstrução pelo *software* NRecon.

Os parâmetros analisados na região medular e na cortical seguiram as recomendações de Bouxsein *et al.*(64). Os seguintes parâmetros para o osso medular foram analisados: densidade mineral óssea; fração de volume ósseo (volume ósseo/volume total); número, espessura e separação das trabéculas. Para a região cortical, os parâmetros avaliados foram: área total, área da cortical óssea, espessura média da cortical e fração cortical óssea.

4.4.6. Análise estatística

Os dados dos testes *in vitro*: de rugosidade superficial, viabilidade celular, produção da fosfatase alcalina e mineralização foram analisados com auxílio do programa *GraphpadPrism* versão 5, com nível de significância de 5%. A distribuição normal dos dados foi comprovada pelo teste de Shapiro-Wilk. O princípio da homocedasticidade foi confirmado e os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Da mesma forma, os parâmetros das microtomografias computadorizadas do teste *in vivo* também foram analisados com auxílio do programa *GraphpadPrism* versão 5, com nível de significância de 5%. A distribuição normal dos parâmetros analisados por microtomografia computadorizada foi comprovada pelo teste de Shapiro-Wilk. O princípio da homocedasticidade foi confirmado e os dados foram submetidos a análise pelo teste T pareado (para comparação dos grupos controle e experimental) e pelo teste T não pareado (para comparação intragrupos nos dois diferentes tempos de eutanásia), com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da rugosidade superficial

Imagens topográficas tridimensionais das três diferentes superfícies (Ticp, BGTi37 e BGTi600) foram obtidas por microscopia de força atômica, com campos de varredura de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ e $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ (FIG.6).

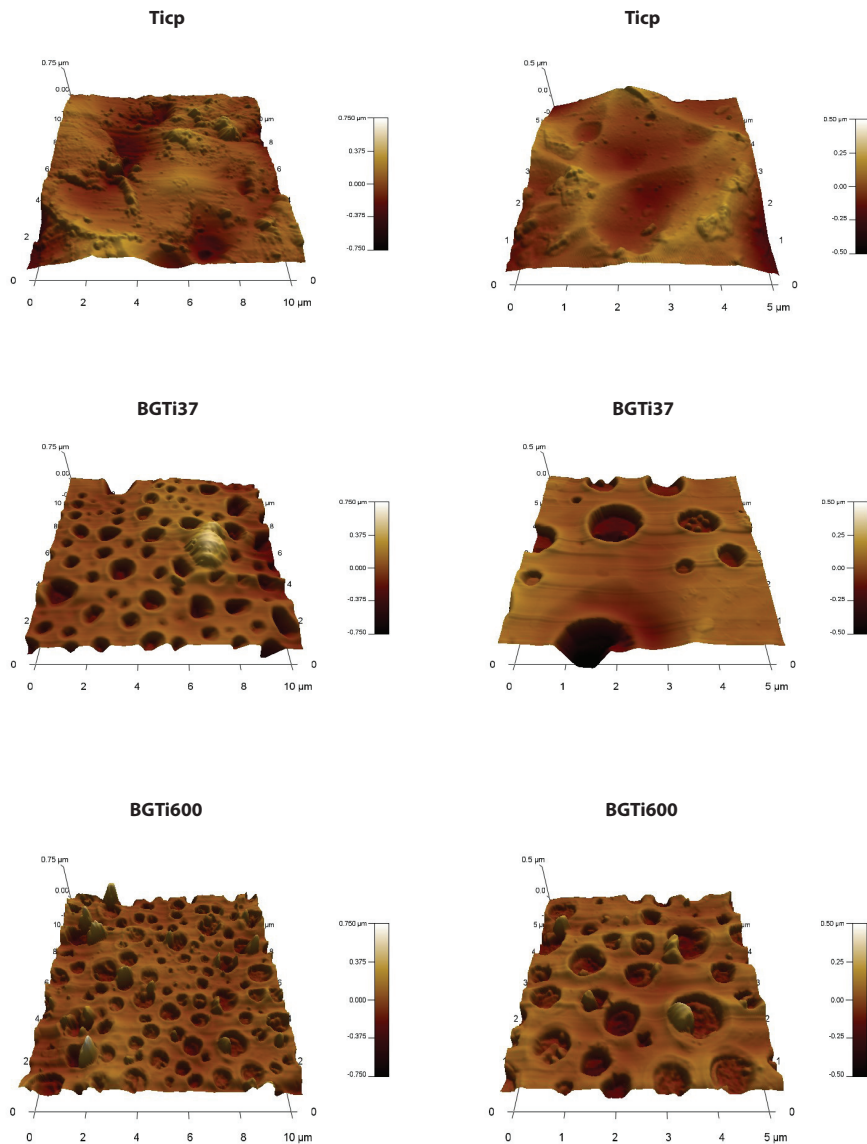


FIGURA 6: Topografia por microscopia de força atômica ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$ e $5 \times 5 \mu\text{m}^2$) das superfícies Ticp, BGTi37 e BGTi600.

Uma das imagens do grupo BGTi600 não pôde ser analisada devido à sua baixa qualidade.

A comparação das rugosidades superficiais dos três grupos pode ser visualizada na figura 7.

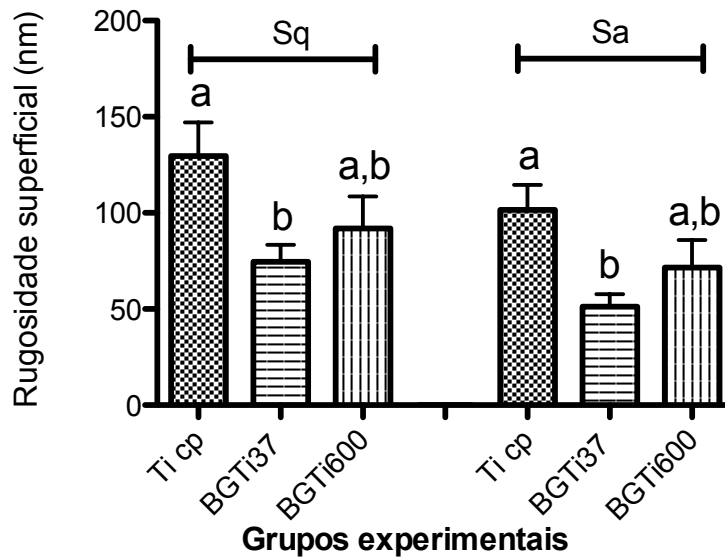


FIGURA 7: Rugosidade quadrática média (Sq) e rugosidade aritmética (Sa) em nanômetros das superfícies Ticp, BGTi37 e BGTi600. Barras com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ($p > 5\%$) (ANOVA seguido por teste de Tukey).

O revestimento de vidro bioativo contendo fosfato de cálcio diminuiu a rugosidade média quando comparada ao Ticp. O grupo de titânio microtexturizado apresentou a maior rugosidade superficial, semelhante estatisticamente ao grupo BGTi600. O grupo BGTi37 apresentou rugosidade superficial significativamente menor do que o Ticp. Os dois grupos experimentais, BGTi37 e BGTi600, apresentaram rugosidade superficial semelhante.

5.2. Estudo experimental *in vitro*

5.2.1. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A viabilidade dos osteoblastos foi avaliada pelo ensaio de MTT após 7 dias de cultura (FIG. 8).

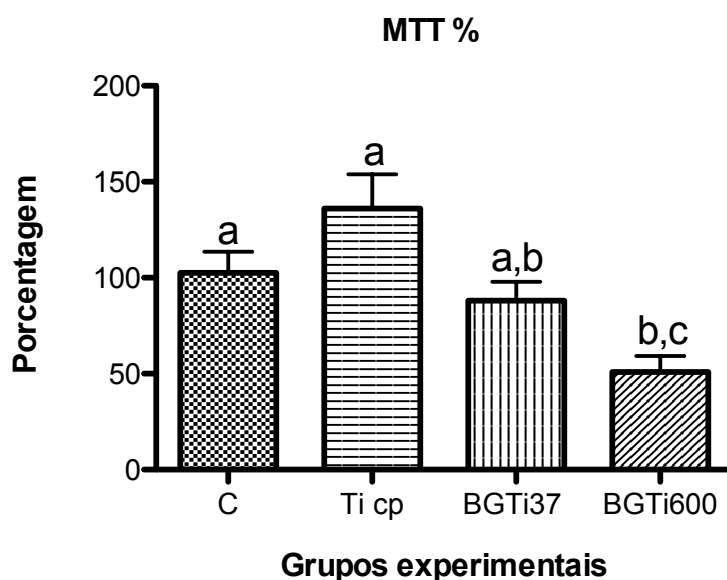


FIGURA 8: Viabilidade celular (MTT %) dos osteoblastos cultivados por 7 dias na ausência de qualquer substrato (C) ou em contato com as superfícies Ticp, BGTi37 e BGTi600. Barras com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ($p > 5\%$) (ANOVA seguido por teste de Tukey).

A proporção de células viáveis em contato com os espécimes de titânio do grupo BGTi600 foi significativamente menor em relação aos grupos controle e do titânio microtexturizado (Ticp). A proporção de células viáveis do grupo experimental BGTi600 não foi significativamente diferente quando comparada ao outro grupo experimental (BGTi37). A proporção de células viáveis dos grupos controle, Ticp e BGTi37 foi estatisticamente semelhante.

5.2.2. Ensaio de produção de fosfatase alcalina

A produção de fosfatase alcalina foi determinada pelo ensaio BCIP NBT após 7 dias de cultura (FIG. 9).

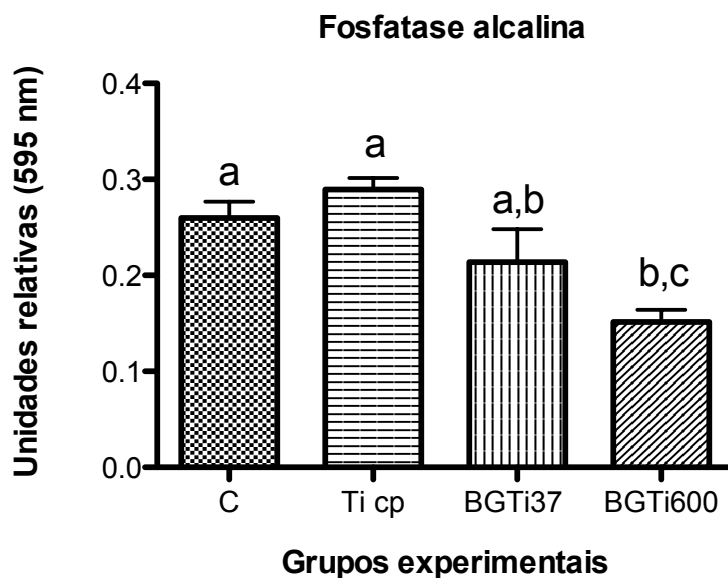


FIGURA 9: Produção de fosfatase alcalina (unidades relativas) dos osteoblastos cultivados por 7 dias na ausência de qualquer substrato (C) ou em contato com as superfícies Ticp, BGTi37 e BGTi600. Barras com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ($p > 5\%$) (ANOVA seguido por teste de Tukey).

A produção da fosfatase alcalina dos osteoblastos em contato com os espécimes de titânio do grupo BGTi600 foi significativamente menor do que a das células do grupo controle e do titânio microtexturizado (Ticp). A produção da fosfatase alcalina do grupo experimental BGTi600 não foi significativamente diferente quando comparada ao outro grupo experimental (BGTi37). A produção da fosfatase alcalina dos grupos controle, Ticp e BGTi37 foi estatisticamente semelhante.

5.2.3. Ensaio de mineralização (vermelho de alizarina)

O grau de mineralização da matriz óssea foi avaliado pelo ensaio vermelho de alizarina, após 14 dias de cultura (FIG. 10).

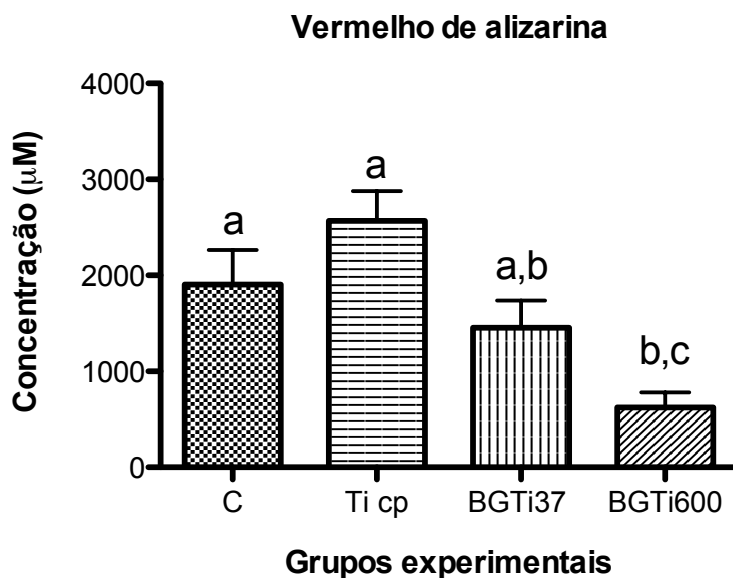


FIGURA 10: Mineralização da matriz, por vermelho de alizarina (μM), após 14 dias de cultivo dos osteoblastos na ausência de qualquer substrato (C) ou em contato com as superfícies Ticp, BGTi37 e BGTi600. Barras com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ($p > 5\%$) (ANOVA seguido por teste de Tukey).

A mineralização observada no grupo BGTi600 foi significativamente menor do que a do grupo controle e do titânio microtexturizado (Ticp). A mineralização do grupo experimental BGTi600 não foi significativamente diferente quando comparada ao outro grupo experimental (BGTi37). A mineralização dos grupos controle, Ticp e BGTi37 foi estatisticamente semelhante.

5.2.4. Avaliação da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura

Após 7 e 14 dias de cultura, a quantidade e o aspecto morfológico das células aderidas aos espécimes de titânio foram avaliados qualitativamente por microscopia eletrônica de varredura.

Na figura 11, é possível observar a colonização dos osteoblastos, após 7 dias de cultura, sobre as superfícies Ticp, BGTi37 e BGTi600.

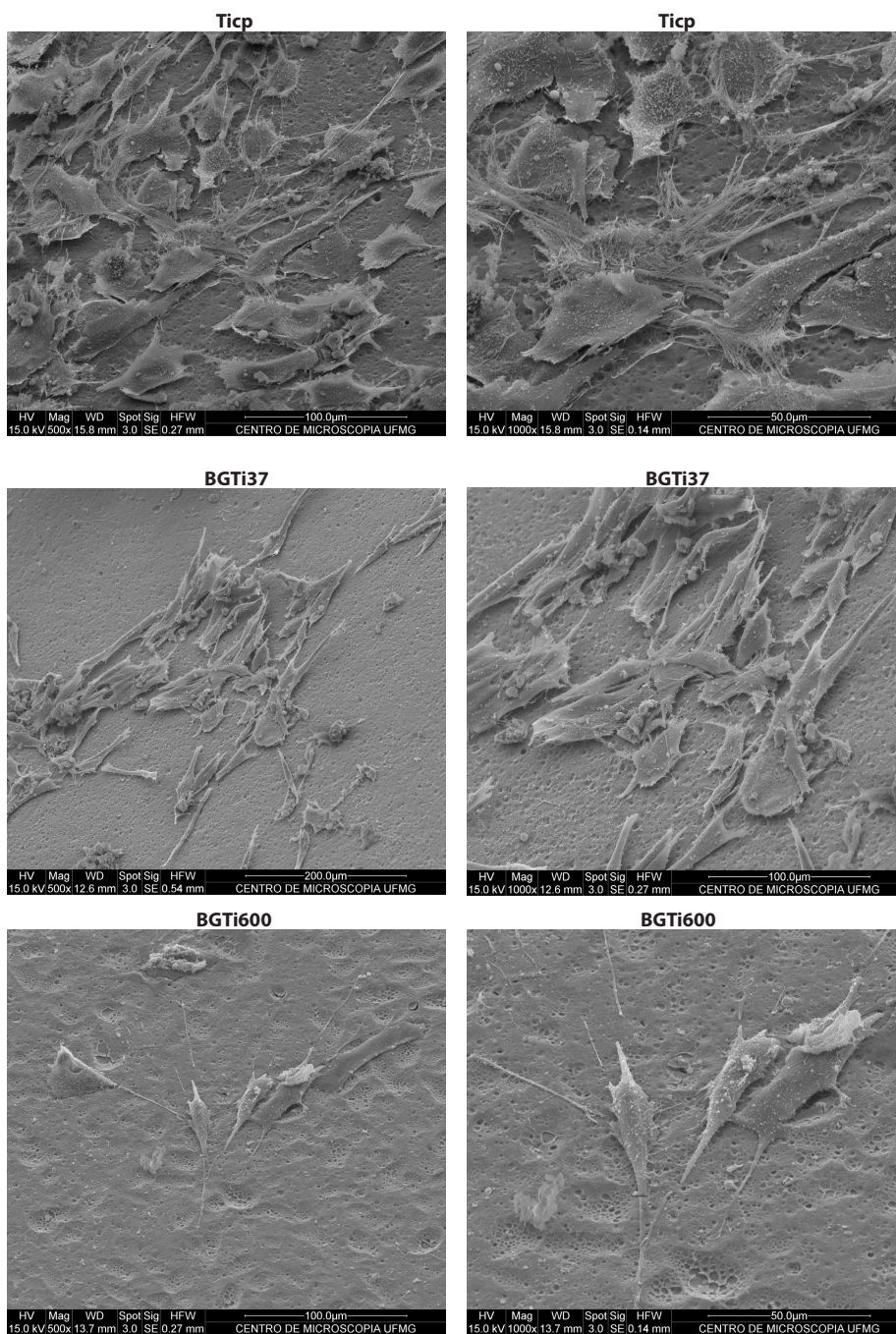


FIGURA 11: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos osteoblastos cultivados por 7 dias sobre as três diferentes superfícies (Ticp, BGTi37 e BGTi600).

Na figura 12, é possível observar a colonização dos osteoblastos após 14 dias de cultura sobre as superfícies Ticp, BGTi37 e BGTi600.

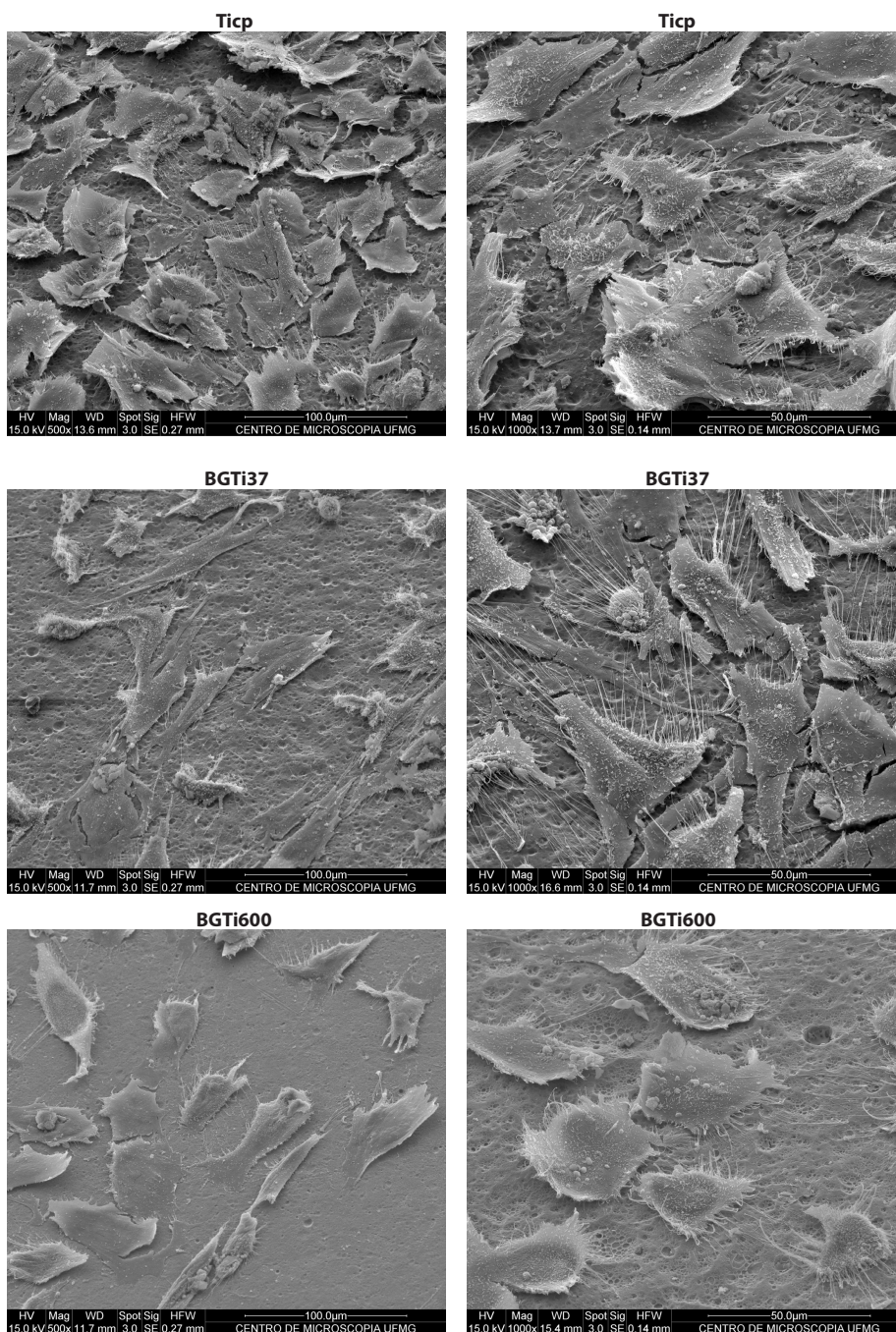


FIGURA 12: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos osteoblastos cultivados por 14 dias sobre as três diferentes superfícies (Ticp, BGTi37 e BGTi600).

O número de células em contato com todas superfícies foi maior no período de 14 dias comparado ao período de 7 dias. A quantidade de células observadas em contato com a superfície de Ticp foi maior quando comparada às demais superfícies (BGTi37 e BGTi600). A menor quantidade de células foi observada em contato com a superfície BGTi600.

Na figura 13, é possível observar, em maior aumento, o aspecto dos osteoblastos após os diferentes períodos de cultura (7 e 14 dias) sobre a superfície Ticp, BGTi37 e BGTi600.

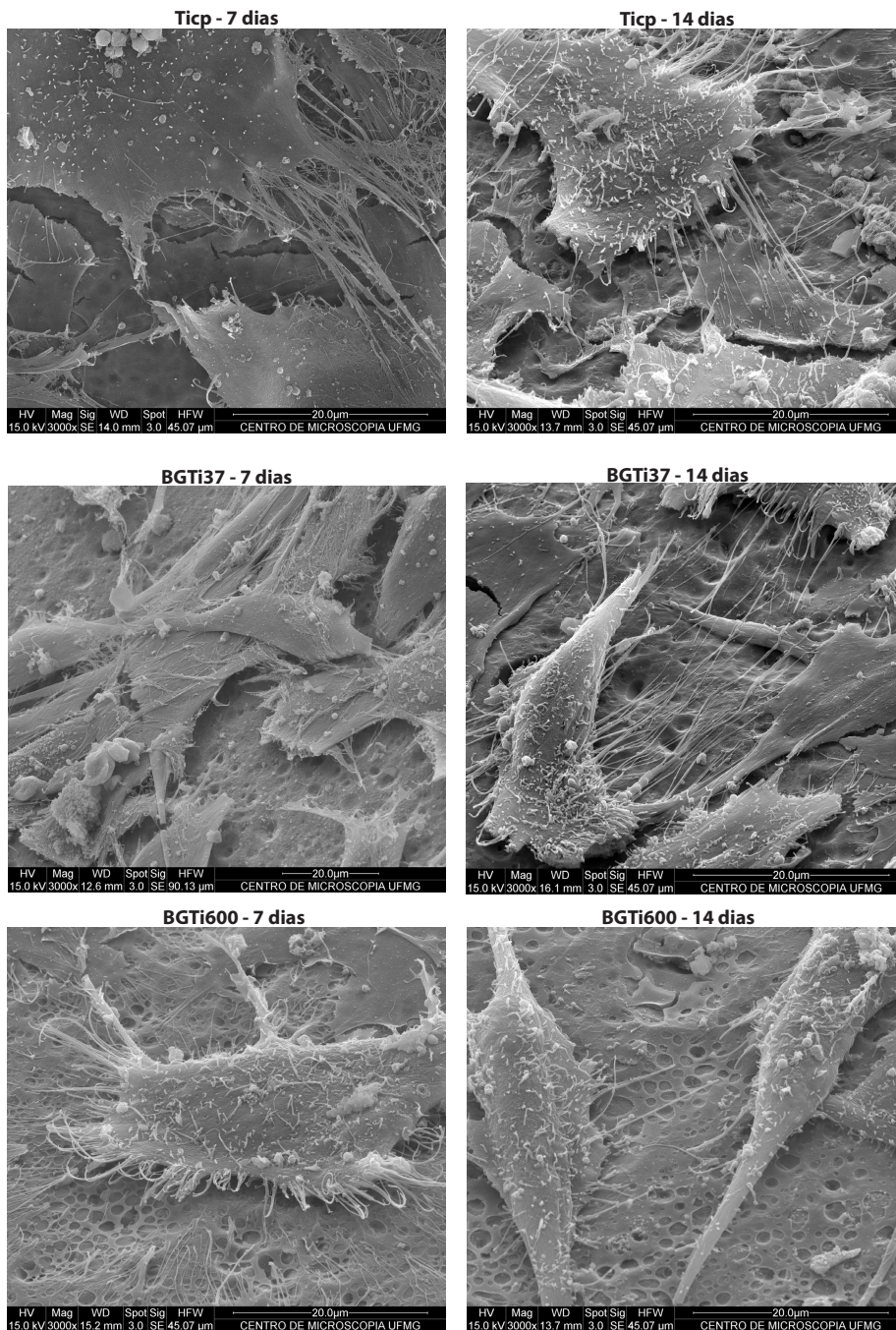


FIGURA 13: Morfologia dos osteoblastos cultivados por 7 e 14 dias sobre as três diferentes superfícies (Ticp, BGTi37 e BGTi600), observada por microscopia eletrônica de varredura.

Em ambos períodos de cultura (7 e 14 dias), as células em contato com a superfície Ticp apresentam-se maiores, em maior número e com morfologia poligonal, ao passo que as células em contato com as superfícies experimentais (BGTi37 e BGTi600) apresentam-se menores, em menor número e com morfologia mais alongada, mais notadamente nas células em contato com a superfície BGTi600. A quantidade de prolongamentos citoplasmáticos, junções intercelulares e vesículas observadas nos espécimes do grupo BGTi600 foi notadamente menor do que nos grupos Ticp e BGTi37.

5.3. Estudo experimental *in vivo*

As tíbias dos animais onde foram inseridos os parafusos dos grupos controle (Ticp) e teste (BGTi37) foram avaliadas por microtomografia computadorizada e os dados das regiões cortical e medular foram analisados separadamente.

5.3.1. Osso cortical

Para a região cortical, os parâmetros avaliados foram: área total, área da cortical óssea, espessura média da cortical e fração da cortical óssea (FIG. 14).

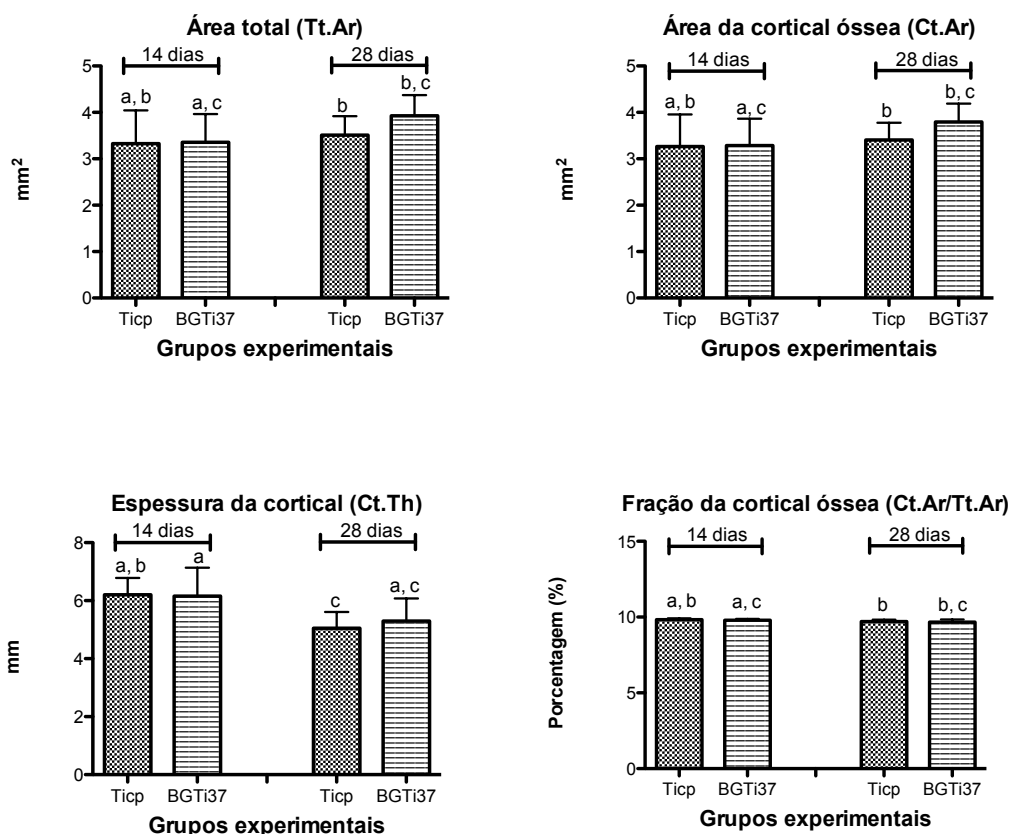


FIGURA 14: Parâmetros do osso cortical avaliados por microtomografia computadorizada dos grupos controle (Ticp) e teste (BGTi37) em dois diferentes períodos (14 e 28 dias). Barras com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ($p > 5\%$) (Teste T pareado para comparação entre Ticp e BGTi37 e Teste T não pareado para comparação intragrupos nos tempos 14 e 28 dias).

Todos os parâmetros avaliados (área total, área da cortical óssea, espessura da cortical e fração da cortical óssea) foram semelhantes estatisticamente quando comparou-se os grupos Ticp (teste) e BGTi37 (controle).

Na comparação dos dois diferentes períodos (14 e 28 dias), somente o parâmetro espessura da cortical do grupo Ticp (controle) apresentou valores estatisticamente diferentes e inferiores no período mais longo (28 dias) comparado aos observados no período mais curto (14 dias). Os outros três parâmetros (área total, área da cortical óssea e fração da cortical óssea) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos dois diferentes períodos de tempo dentro do grupo controle (Ticp).

Os valores de todos os parâmetros avaliados quando comparou-se o grupo BGTi37 (teste) nos dois diferentes períodos (14 e 28 dias) foram semelhantes estatisticamente.

5.3.2. Osso medular

Os seguintes parâmetros para o osso medular foram analisados: densidade mineral óssea; fração de volume ósseo (volume ósseo/volume total); espessura, número e separação das trabéculas(FIG. 15).

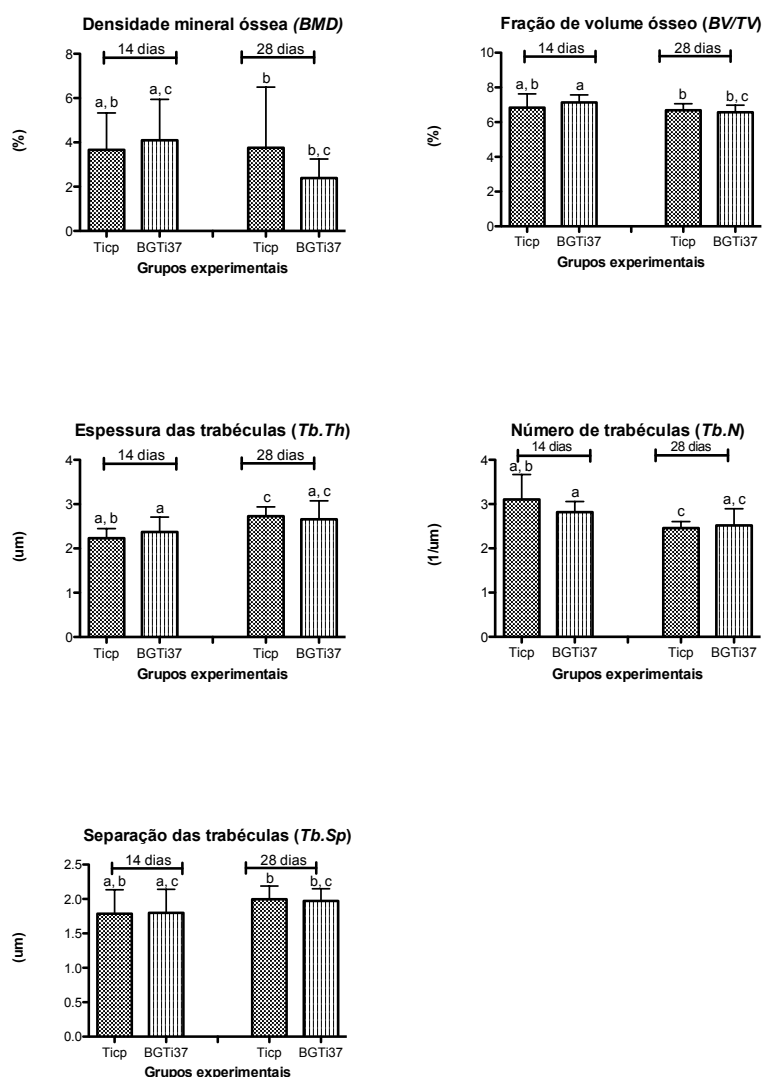


FIGURA 15: Parâmetros do osso medular avaliados por microtomografia computadorizada dos grupos controle (Ticp) e teste (BGTi37) em dois diferentes períodos (14 e 28 dias). Barras com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes ($p > 5\%$) (Teste T pareado para comparação entre Ticp e BGTi37 e Teste T não pareado para comparação nos tempos 14 e 28 dias).

Todos os parâmetros avaliados (densidade mineral óssea, fração de volume ósseo, espessura, número e separação das trabéculas) foram semelhantes estatisticamente quando comparou-se os grupos Ticp (controle) e BGTi37 (teste).

Na comparação dos dois diferentes períodos (14 e 28 dias), os parâmetros espessura e número das trabéculas do grupo Ticp (controle), apresentaram valores estatisticamente diferentes. A espessura das trabéculas em contato com os parafusos do grupo Ticp (controle) foi significativamente menor no período de 14 dias comparado a observada no período de 28 dias. Já o número de trabéculas em contato com os parafusos do grupo Ticp (controle) foi significativamente maior no período de 14 dias comparado ao observado no período de 28 dias. Os demais parâmetros (densidade mineral óssea, fração de volume ósseo e separação das trabéculas) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos dois diferentes períodos de tempo dentro do grupo controle (Ticp).

Ainda comparando-se os dois diferentes períodos (14 e 28 dias), o parâmetro fração de volume ósseo do grupo BGTi37 (experimental) foi significativamente maior no período de 14 dias quando comparado ao período de 28 dias. Os demais parâmetros (densidade mineral óssea; espessura, número e separação das trabéculas) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos dois diferentes períodos de tempo dentro do grupo experimental (BGTi37).

6. DISCUSSÃO

Estudos *in vitro*, que permitem estimar os vários aspectos da interação celular com os novos materiais, têm um papel crucial na avaliação biológica de novos biomateriais aplicados à implantodontia. Esses estudos simulam parcialmente alguns aspectos da função e sinalização celular após a implantação do biomaterial(5). Além disso, a sua reprodutibilidade, definição temporal dos eventos ocorridos, redução da morbidade e mortalidade animal e o relativo baixo custo são algumas vantagens da cultura celular para pesquisas na área de implantodontia. Uma das limitações desse tipo de estudo é que os espécimes são opacos e portanto não é possível avaliar por microscopia por luz transmitida. Dessa forma, métodos alternativos como a microscopia eletrônica de varredura precisam ser utilizados para avaliar a morfologia e distribuição das células sobre a superfície dos espécimes testados(27).

Revestimentos nanométricos, como o testado nesse trabalho, devido às suas dimensões possibilitam a interação com as células de maneira mais apropriada, desempenhando um papel importante na adsorção de proteínas, na organização do citoesqueleto, adesão e sinalização dos osteoblastos e na osseointegração(6, 15).

Nesse estudo, a aplicação de um revestimento de vidro bioativo contendo fosfato de cálcio sobre uma superfície de titânio microtexturizada (Ticp) reduziu sua rugosidade, aferida por meio da microscopia de força atômica. Comparando-se a rugosidade do grupo Ticp com a revestida com BGTi37, observou-se uma redução de aproximadamente 50%. Da mesma forma, a rugosidade da superfície revestida com BGTi600 apresentou uma redução de aproximadamente 30%.

Utilizando a mesma metodologia e corroborando os resultados desse estudo, Pereira *et al.*(13) observaram que o revestimento de fosfato de cálcio, aplicado sobre uma superfície de titânio microtexturizada por jateamento e ataque ácido, reduziu em aproximadamente 50% a rugosidade inicial.

Van Oirschot *et al.* determinaram a rugosidade das superfícies controle e experimentais testadas em modelo animal e reafirmaram que, a incorporação de um revestimento de hidroxiapatita, associado ou não a um

vidro bioativo, sobre uma superfície jateada e tratada com ácido, resultou na diminuição da rugosidade superficial(65).

Como os revestimentos superficiais modificam simultaneamente a rugosidade e a composição química, ainda permanece inconclusivo se é a rugosidade ou se são as propriedades químicas que mais interferem na proliferação e ativação celular.

Pereira *et al.*(13) testaram superfícies de titânio revestidas por fosfato de cálcio associado a um peptídeo derivado do colágeno tipo I. Todos os grupos testados não apresentaram citotoxicidade, o que não foi encontrado nesse estudo, onde o grupo revestido com fosfato de cálcio e seco em altas temperaturas (BGTi600) foi citotóxico.

Massaro *et al.*(46), testando três diferentes métodos de deposição de hidroxiapatita sobre a superfície de titânio microtexturizado, demonstraram boa viabilidade celular dos osteoblastos humanos em contato com todas superfícies testadas. Porém o número de células viáveis em contato com uma das superfícies experimentais submetida a um tratamento térmico a 500^oC por 2 horas também foi significativamente menor quando comparado ao titânio, semelhante ao resultado do presente estudo que demonstrou que a proporção de células viáveis em contato com a superfície experimental BGTi600 foi menor que o grupo Ticip.

Gao *et al.*(48) observaram pelo ensaio de MTT maior quantidade de osteoblastos primários viáveis em contato com superfícies de titânio recobertas com uma combinação de beta e alfa tricálcio fosfato nos períodos de 4 e 8 dias de cultura, quando comparado à uma superfície lisa de titânio. Os resultados do presente estudo não demonstraram maior viabilidade celular em contato com as superfícies revestidas, diferindo do estudo de Gao *et al.*

A viabilidade de células osteoblásticas da calvária de ratos neonatos, em contato com a superfície de titânio jateada (Ti-6Al-7Nb) e revestida com fosfato de cálcio na forma de hidroxiapatita, foi testada por de Lavos-Valereto(27). Observou-se que a superfície revestida apresentou menor viabilidade celular quando comparada ao grupo controle, onde as células proliferaram na ausência de qualquer espécime, nos períodos de 7 e 11 dias, exatamente o que foi encontrado no presente estudo.

Outros autores(27) observaram uma maior produção de matriz extracelular pelas células em contato com a superfície revestida com fosfato de cálcio, sugerindo maior atividade dos osteoblastos.

Marcadores genéticos do colágeno tipo I, principal constituinte da matriz extracelular, tem sido observados nos estágios precoces de proliferação dos osteoblastos, precedendo a expressão da fosfatase alcalina, observada no período pós proliferação, durante a maturação da matriz extracelular(10). A produção da matriz extracelular, o último evento da diferenciação dos osteoblastos, é essencial na formação do tecido ósseo na interface com o biomaterial. Essa matriz extracelular é essencial também na osseointegração dos implantes(4), e portanto a presença de maior quantidade de matriz extracelular poderá resultar em osseointegração mais rápida.

O fato do grupo BGTi600, testado nesse trabalho, ter apresentado menor viabilidade celular e ter sido citotóxico para os osteoblastos primários de ratos, provavelmente se deve à formação e acúmulo de carbonato de cálcio (CaCO_3) após o tratamento térmico utilizado para produção dessa superfície experimental. A identificação dos elementos químicos presentes nessa superfície, avaliada por meio da espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS), apontou a presença desse composto químico (CaCO_3) na superfície BGTi600. Horie *et al.*(66)demonstraram que partículas nanométricas e altamente solúveis de carbonato de cálcio tem o potencial de provocar apoptose ou inibição do crescimento celular, devido a liberação de cálcio intracelular. A análise por espectroscopia fotoeletrônica de raios X do grupo BGTi37, que não apresentou nenhuma citotoxicidade, não revelou a presença de carbonato de cálcio, reforçando essa hipótese.

Os resultados de produção da fosfatase alcalina sugerem que as superfícies revestidas com vidro bioativo contendo fosfato de cálcio retardaram a diferenciação e ativação dos osteoblastos nas fases iniciais sendo corroborados por outros autores(13, 14). Após esse retardo inicial, a atividade celular parece aumentar, o que culminou em maior mineralização da matriz observada por Pereira *et al.* (13) após 21 dias de cultivo. Essa maior mineralização não foi observada no presente trabalho, provavelmente por ter sido avaliada em período mais curto (14 dias). A diferença nos

períodos de avaliação também pode explicar o fato de Klymov *et al.*(15) terem observado maior mineralização da matriz após osteoblastos imortalizados terem sido estimulados por uma superfície revestida com fosfato de cálcio após 28 dias de cultivo, o dobro do período de avaliação do presente trabalho.

Jimbo *et al.*(32) demonstraram que a expressão gênica da fosfatase alcalina no tecido ósseo adjacente aos implantes de titânio revestidos com fosfato de cálcio, instalados nas tíbias de coelhos eutanasiados nos períodos de 14 e 28 dias, foi maior do que no grupo de implantes não revestidos. No presente estudo a produção da fosfatase alcalina do grupo BGTi37 foi semelhante ao TcP e menor no grupo BGTi600. Contudo os períodos de avaliação e os animais foram diferentes.

A produção da fosfatase alcalina por osteoblastos de coelhos em contato com superfícies contendo íons cálcio, observada por Feng *et al.*(18), foi maior quando comparada ao titânio não revestido. Nesse experimento, essa produção foi avaliada em período mais precoce (24 horas) e a superfície controle de titânio não revestido era polida, diferentemente da superfície de titânio microtexturizada testada no presente trabalho que, conforme outro trabalho já demonstrou, apresentou maiores concentrações de marcadores osteogênicos do que as superfícies lisas de titânio(67).

Ehara *et al.*(28) afirmaram que a presença de fosfato de cálcio, mais especificamente do alfa tricálcio fosfato (α TCP) e tetracálcio fosfato (TetCP), solubilizados no meio de cultura de células osteoblásticas imortalizadas (MC3T3), provocou maior diferenciação destas células nos estágios iniciais, em especial no período de 3 dias de cultivo. Já no período de 7 dias, a produção da fosfatase alcalina foi semelhante para os grupos testados com e sem fosfatos de cálcio. Provavelmente, essa maior diferenciação celular em tempos precoces foi influenciada pela solubilização mais rápida dos íons, diferentemente do observado nesse estudo, pois sugere-se que a solubilização do revestimento testado no presente estudo ocorra em um período mais longo. O fato desses autores terem observado que o pico da produção da fosfatase alcalina dos osteoblastos em contato com os meios contendo os fosfatos de cálcio tenha ocorrido no período de 3 dias de cultivo e diminuído no período de 7 dias poderia confirmar a hipótese de que todos

os íons solubilizados já tenham reagido. Essa hipótese da solubilização também poderia ser confirmada pela maior ativação celular no grupo de alfa tricálcio fosfato (α TCP) do que o de tetracálcio fosfato (TetCP), já que o primeiro é mais solúvel que o segundo(5). Essa hipótese ainda pode ser a justificativa para a consequente maior mineralização observada por esses autores após exposição aos diferentes fosfatos de cálcio testados (α TCP e TetCP), diferindo da menor mineralização observada nos grupos experimentais revestidos BGTi37, e mais notadamente no grupo BGTi600, quando comparado aos grupos controle e titânio microtexturizado do presente trabalho.

Essa variação de maior ou menor produção da fosfatase alcalina em contato com superfícies de fosfato de cálcio pode ser parcialmente explicada pelas diferentes linhagens celulares e tempos de avaliação. Os resultados de Knabe *et al.*(10) demonstraram que osteoblastos humanos em contato com revestimento de hidroxiapatita apresentaram maior atividade. Contudo, em outro trabalho do mesmo autor(47), células da medula óssea de ratos em contato com a mesma superfície apresentaram crescimento tardio. Conforme afirmaram Barrere, vanBlitterswijk e Groot(25), a influência dos íons Ca^{2+} na atividade dos osteoblastos depende do tipo e do estágio de diferenciação celular.

Essa variação de produção da fosfatase alcalina também pode estar relacionada aos diferentes métodos de preparação de superfícies de titânio revestidas por fosfato de cálcio, segundo Massaro *et al.*(46). A produção da fosfatase alcalina de osteoblastos humanos foi maior na superfície de titânio recoberta com hidroxiapatita pelo método sol gel quando comparada com as recobertas pelo método de spray de plasma ou pulverização, após 10 dias de cultivo celular.

Assim como outros autores(13), nesse estudo, optou-se por avaliar a produção da fosfatase alcalina no período mais curto do que a mineralização. A analogia realizado por outros autores(28) dos estágios celulares com os da osteogênese também justifica essa escolha, já que a mineralização da matriz produzida pelos osteoblastos ocorre somente após sua produção, que é precedida por sua ativação e diferenciação.

Ainda sobre o período para avaliação da mineralização, Klymov *et al.*(15) demonstraram que a mineralização decorrente da concentração de cálcio só aumenta significativamente em períodos mais longos de avaliação. Portanto, no presente trabalho, optou-se por avaliar a mineralização pelo vermelho de alizarina somente após 14 dias.

Assim como em outros trabalhos(13, 27, 46, 48, 68), no presente estudo, os osteoblastos em contato com as superfícies Ticp e BGTi37, observados por microscopia eletrônica de varredura, apresentaram morfologia plana e poligonal, com diversas extensões citoplasmáticas. Porém, a morfologia dos osteoblastos em contato com a superfície BGTi600, mais alongados e com menor quantidade de prolongamentos citoplasmáticos e vesículas, sugerem que essas células apresentavam maior dificuldade de adesão à essa superfície, menor proliferação e atividade celular quando comparado aos osteoblastos em contato com as superfícies dos grupos Ticp e BGTi37.

Assim como Gao *et al.*(48), o presente trabalho observou aumento no número de células em contato com todas as superfícies testadas no período mais longo de cultura, demonstrando proliferação dos osteoblastos durante o período testado.

A validade do uso das microtomografias computadorizadas como método quantitativo de análise da interface entre osso e miniplantes em ratos já é conhecida na literatura. Sua correlação positiva com os resultados histomorfométricos foi confirmada por Butz *et al.*(50). Da mesma forma, sua correlação com os resultados de estabilidade mecânica de implantes instalados em tíbias de ratos foi confirmada por Gabet *et al.*(51). Esforços têm sido realizados para buscar a uniformização dos parâmetros de aquisição e análise das imagens, a fim de facilitar a comparação dos dados de diferentes estudos(64).

Os resultados do estudo *in vivo*, quando comparou-se o grupo controle (Ticp) ao grupo teste (BGTi37), corroboram os resultados dos ensaios *in vitro*, que, de modo geral, também demonstraram não haver diferenças estatisticamente significativas entre esses dois grupos.

Na região cortical, os resultados do presente trabalho apontaram não haver qualquer diferença significativa nos parâmetros de microtomografia

computadorizada avaliados que possam ser atribuídos à presença do revestimento testado (BGTi37). Butz *et al.*(50) também não observaram alteração na fração da cortical óssea associada à presença de implantes de titânio microtexturizados e não revestidos.

A única diferença significativa ($p=0,0040$) encontrada na região cortical foi observada no parâmetro espessura da cortical, quando se comparou a superfície Ticp (controle) nos dois diferentes períodos de avaliação (14 e 28 dias), com valores inferiores no período mais longo. Essa diferença não foi encontrada quando se comparou a superfície BGTi37, sugerindo melhor manutenção de osso na região cortical do que a superfície Ticp (controle).

Corroborando os resultados da avaliação do osso medular apresentados nesse trabalho, Kuroda *et al.*(49) também não observaram diferenças estatisticamente significativas da fração de volume ósseo em contato com os implantes dos grupos testados (microtexturizados e revestidos com hidroxiapatita), instalados em fêmures de ratos, após 7, 14 e 28 dias. De maneira semelhante, Cuijpers *et al.*(53) também não observaram diferenças significativas na fração de volume ósseo ao redor de implantes de titânio microtexturizados revestidos ou não revestidos com fosfato de cálcio, após um período de 8 semanas, instalados nas tíbias de ratas. Dessa forma, nem o revestimento com vidro bioativo rico em fosfato de cálcio testado nesse trabalho, nem os revestimentos compostos por fosfato de cálcio testados pelos autores acima citados, resultaram em maior formação óssea na região medular próximo aos implantes.

Contrariando esses resultados, Anitua *et al.*(24) atribuíram à presença de íons Ca a melhora dos parâmetros de mineralização observados ao redor de implantes, quando comparado aos implantes de titânio microtexturizados e não revestidos. Ressalta-se aqui que esses autores realizaram o trabalho em somente 2 ovelhas, número amostral reduzido e diferente do modelo animal testado nesse trabalho e nos trabalhos de Kuroda *et al.*(49) e Cuijpers *et al.*(53).

As porcentagens médias de fração de volume ósseo observados no presente trabalho, variando de 6,5 a 7,1%, são notadamente inferiores às relatadas por outros autores que também avaliaram esse parâmetro em torno de parafusos instalados nas tíbias de ratos. Gabet *et al.* (51) relataram fração

de volume ósseo de 22% para o grupo de ratas não ovariectomizadas e de 15% para o grupo de ratas ovariectomizadas. Já Pyo *et al.* (52) relataram fração de volume ósseo de 30,74% para o grupo de ratas ovariectomizadas, o dobro do relatado por Gabet *et al.* (51). Atribui-se que essa grande variação de valores deve-se às diferenças do local de instalação dos parafusos. Como afirmaram Bouxsein *et al.* (64), a fração de volume ósseo pode variar notadamente em função do local de inserção desses parafusos em ratos. Devido às pequenas dimensões do local de inserção dos parafusos nesse animais, diferenças de localização de poucos milímetros podem resultar em valores bastante discrepantes.

As diferenças significativas da espessura ($p=0,0016$) e número das trabéculas ($p=0,0196$) do grupo Ticp (controle), observadas nos dois diferentes períodos (14 e 28 dias), sugerem que houve uma remodelação óssea positiva, com uma diminuição do número de trabéculas e aumento da sua espessura, tornando a região medular mais densa. Essa remodelação positiva em torno dos parafusos de titânio microtexturizados observada no presente estudo, reflete o comportamento clínico observado em torno de implantes de titânio microtexturizados, com altas taxas de sucesso associado a essa superfície.

A diferença significativa ($p=0,0420$) entre a fração de volume ósseo do grupo BGTi37 (experimental), observada nos dois diferentes períodos (14 e 28 dias), sugere uma remodelação óssea negativa. Contudo, os outros quatro parâmetros de osso medular analisados não apontaram nenhuma diferença que pudesse comprovar essa remodelação negativa. Nas imagens analisadas, em função da localização dos parafusos instalados, também não é possível reafirmar essa perda, o que impediu uma conclusão clara de que essa remodelação negativa tenha ocorrido.

De uma maneira geral, os resultados do presente estudo *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a superfície BGTi37 apresentou comportamento biológico semelhante ao da superfície de titânio microtexturizada produzida por jateamento seguido por erosão ácida (Ticp). Fato interessante já que esse tipo de superfície de titânio (Ticp), utilizado no presente trabalho como controle, é atualmente a mais utilizada comercialmente, com altas taxas de

sobrevivência (98,8%)(3) e de sucesso (97%)(2) comprovados por estudos retrospectivos e prospectivos com período de acompanhamento de 10 anos.

Para desenvolver superfícies de implante que otimizem as respostas das células e dos tecidos, ainda são necessários conhecimentos da resposta celular em contato com esses revestimentos. Por conseguinte, novos testes *in vitro*, reproduzindo a mesma configuração experimental, utilizando-se a mesma linhagem celular e os mesmos períodos de avaliação parecem ser de grande valia para definir como os revestimentos de vidro bioativo contendo fosfato de cálcio interferem nos mecanismos de adesão, proliferação e maturação dos osteoblastos.

7. CONCLUSÃO

A superfície BGTi37 apresentou comportamento biológico semelhante à uma superfície de titânio microtexturizada (Ticp), com ótimos resultados de longo prazo já consolidados na literatura. Fato bastante promissor, considerando as possibilidades de aprimoramento dessa superfície experimental em futuros estudos.

REFERÊNCIAS

1. Koller G, Cook RJ, Thompson ID, Watson TF, Di Silvio L. Surface modification of titanium implants using bioactive glasses with air abrasion technologies. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18(12):2291-6.
2. van Velzen FJ, Ofec R, Schulten EA, Ten Bruggenkate CM. 10-year survival rate and the incidence of peri-implant disease of 374 titanium dental implants with a SLA surface: a prospective cohort study in 177 fully and partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(10):1121-8.
3. Buser D, Janner SF, Wittneben JG, Brägger U, Ramseier CA, Salvi GE. 10-year survival and success rates of 511 titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a retrospective study in 303 partially edentulous patients. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012;14(6):839-51.
4. Aparicio C, Gil FJ, Planell JA, Engel E. Human-osteoblast proliferation and differentiation on grit-blasted and bioactive titanium for dental applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2002;13(12):1105-11.
5. Surmenev RA, Surmeneva MA, Ivanova AA. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis--a review. *Acta Biomater*. 2014;10(2):557-79.
6. Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20 Suppl 4:185-206.
7. Ellingsen JE. Surface configurations of dental implants. *Periodontol* 2000. 1998;17:36-46.
8. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20 Suppl 4:172-84.
9. Aparicio C, Padrós A, Gil FJ. In vivo evaluation of micro-rough and bioactive titanium dental implants using histometry and pull-out tests. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011;4(8):1672-82.
10. Knabe C, Howlett CR, Klar F, Zreiqat H. The effect of different titanium and hydroxyapatite-coated dental implant surfaces on phenotypic expression of human bone-derived cells. *J Biomed Mater Res A*. 2004;71(1):98-107.
11. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981;52(2):155-70.
12. Park EK, Lee YE, Choi JY, Oh SH, Shin HI, Kim KH, et al. Cellular biocompatibility and stimulatory effects of calcium metaphosphate on osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells. *Biomaterials*. 2004;25(17):3403-11.
13. Pereira KK, Alves OC, Novaes AB, de Oliveira FS, Yi JH, Zaniquelli O, et al. Progression of osteogenic cell cultures grown on microtopographic titanium coated with calcium phosphate and functionalized with a type I collagen-derived peptide. *J Periodontol*. 2013;84(8):1199-210.
14. Strąkowska P, Beutner R, Gnyba M, Zielinski A, Scharnweber D. Electrochemically assisted deposition of hydroxyapatite on Ti6Al4V substrates

covered by CVD diamond films - Coating characterization and first cell biological results. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;59:624-35.

15. Klymov A, Song J, Cai X, Te Riet J, Leeuwenburgh S, Jansen JA, et al. Increased acellular and cellular surface mineralization induced by nanogrooves in combination with a calcium-phosphate coating. *Acta Biomater*. 2016;31:368-77.

16. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. 2003;24(13):2161-75.

17. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006;27(15):2907-15.

18. Feng B, Weng J, Yang BC, Qu SX, Zhang XD. Characterization of titanium surfaces with calcium and phosphate and osteoblast adhesion. *Biomaterials*. 2004;25(17):3421-8.

19. Xu L, Pan F, Yu G, Yang L, Zhang E, Yang K. In vitro and in vivo evaluation of the surface bioactivity of a calcium phosphate coated magnesium alloy. *Biomaterials*. 2009;30(8):1512-23.

20. Sato M, Aslani A, Sambito MA, Kalkhoran NM, Slamovich EB, Webster TJ. Nanocrystalline hydroxyapatite/titania coatings on titanium improves osteoblast adhesion. *J Biomed Mater Res A*. 2008;84(1):265-72.

21. Shibata Y, Tanimoto Y. A review of improved fixation methods for dental implants. Part I: Surface optimization for rapid osseointegration. *J Prosthodont Res*. 2015;59(1):20-33.

22. Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, et al. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials*. 2005;26(23):4847-55.

23. Anitua E, Piñas L, Murias A, Prado R, Tejero R. Effects of calcium ions on titanium surfaces for bone regeneration. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;130:173-81.

24. Anitua E, Prado R, Orive G, Tejero R. Effects of calcium-modified titanium implant surfaces on platelet activation, clot formation, and osseointegration. *J Biomed Mater Res A*. 2015;103(3):969-80.

25. Barrère F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(3):317-32.

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

27. de Laves-Valereto IC, Deboni MC, Azambuja N, Marques MM. Evaluation of the titanium Ti-6Al-7Nb alloy with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating on growth and viability of cultured osteoblast-like cells. *J Periodontol*. 2002;73(8):900-5.

28. Ehara A, Ogata K, Imazato S, Ebisu S, Nakano T, Umakoshi Y. Effects of alpha-TCP and TetCP on MC3T3-E1 proliferation, differentiation and mineralization. *Biomaterials*. 2003;24(5):831-6.

29. Sisti KE, de Rossi R, Antonioli AM, Aydos RD, Guastaldi AC, Queiroz TP, et al. Surface and biomechanical study of titanium implants modified by laser with and without hydroxyapatite coating, in rabbits. *J Oral Implantol*. 2012;38(3):231-7.

30. Queiroz TP, Souza F, Guastaldi AC, Margonar R, Garcia-Júnior IR, Hochuli-Vieira E. Commercially pure titanium implants with surfaces modified

by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and topographical analysis in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(8):896-903.

31. Souza FA, Queiroz TP, Guastaldi AC, Garcia-Júnior IR, Magro-Filho O, Nishioka RS, et al. Comparative in vivo study of commercially pure Ti implants with surfaces modified by laser with and without silicate deposition: biomechanical and scanning electron microscopy analysis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013;101(1):76-84.

32. Jimbo R, Xue Y, Hayashi M, Schwartz-Filho HO, Andersson M, Mustafa K, et al. Genetic responses to nanostructured calcium-phosphate-coated implants. *J Dent Res.* 2011;90(12):1422-7.

33. van Oirschot BA, Bronkhorst EM, van den Beucken JJ, Meijer GJ, Jansen JA, Junker R. Long-term survival of calcium phosphate-coated dental implants: a meta-analytical approach to the clinical literature. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(4):355-62.

34. Mistry S, Kundu D, Datta S, Basu D. Comparison of bioactive glass coated and hydroxyapatite coated titanium dental implants in the human jaw bone. *Aust Dent J.* 2011;56(1):68-75.

35. Mistry S, Roy R, Kundu B, Datta S, Kumar M, Chanda A, et al. Clinical Outcome of Hydroxyapatite Coated, Bioactive Glass Coated, and Machined Ti6Al4V Threaded Dental Implant in Human Jaws: A Short-Term Comparative Study. *Implant Dent.* 2016;25(2):252-60.

36. Rosa MB, Albrektsson T, Francischone CE, Filho HO, Wennerberg A. Micrometric characterization of the implant surfaces from the five largest companies in Brazil, the second largest worldwide implant market. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28(2):358-65.

37. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont.* 2004;17(5):536-43.

38. Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010;25(1):63-74.

39. Elias CN, Meirelles L. Improving osseointegration of dental implants. *Expert Rev Med Devices.* 2010;7(2):241-56.

40. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials.* 2007;28(32):4748-55.

41. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. Discrete calcium phosphate nanocrystalline deposition enhances osteoconduction on titanium-based implant surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2009;90(2):577-85.

42. Lin A, Wang CJ, Kelly J, Gubbi P, Nishimura I. The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone-implant fixation in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24(5):808-16.

43. Abrahamsson I, Linder E, Larsson L, Berglundh T. Deposition of nanometer scaled calcium-phosphate crystals to implants with a dual acid-etched surface does not improve early tissue integration. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(1):57-62.

44. Orsini G, Piattelli M, Scarano A, Petrone G, Kenealy J, Piattelli A, et al. Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-

- etched surface in the human posterior maxilla. *J Periodontol.* 2007;78(2):209-18.
45. Goené RJ, Testori T, Trisi P. Influence of a nanometer-scale surface enhancement on de novo bone formation on titanium implants: a histomorphometric study in human maxillae. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2007;27(3):211-9.
46. Massaro C, Baker MA, Cosentino F, Ramires PA, Klose S, Milella E. Surface and biological evaluation of hydroxyapatite-based coatings on titanium deposited by different techniques. *J Biomed Mater Res.* 2001;58(6):651-7.
47. Knabe C, Klar F, Fitzner R, Radlanski RJ, Gross U. In vitro investigation of titanium and hydroxyapatite dental implant surfaces using a rat bone marrow stromal cell culture system. *Biomaterials.* 2002;23(15):3235-45.
48. Gao Y, Hu J, Guan TH, Wu J, Zhang CB, Gao B. Physical properties and cellular responses to calcium phosphate coating produced by laser rapid forming on titanium. *Lasers Med Sci.* 2014;29(1):9-17.
49. Kuroda S, Viridi AS, Li P, Healy KE, Sumner DR. A low-temperature biomimetic calcium phosphate surface enhances early implant fixation in a rat model. *J Biomed Mater Res A.* 2004;70(1):66-73.
50. Butz F, Ogawa T, Chang TL, Nishimura I. Three-dimensional bone-implant integration profiling using micro-computed tomography. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006;21(5):687-95.
51. Gabet Y, Müller R, Levy J, Dimarchi R, Chorev M, Bab I, et al. Parathyroid hormone 1-34 enhances titanium implant anchorage in low-density trabecular bone: a correlative micro-computed tomographic and biomechanical analysis. *Bone.* 2006;39(2):276-82.
52. Pyo SW, Kim YM, Kim CS, Lee IS, Park JU. Bone formation on biomimetic calcium phosphate-coated and zoledronate-immobilized titanium implants in osteoporotic rat tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014;29(2):478-84.
53. Cuijpers VM, Alghamdi HS, Van Dijk NW, Jaroszewicz J, Walboomers XF, Jansen JA. Osteogenesis around CaP-coated titanium implants visualized using 3D histology and micro-computed tomography. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(11):3463-73.
54. Domingues RZ, Clark AE, Brennan AB. A sol-gel derived bioactive fibrous mesh. *J Biomed Mater Res.* 2001;55(4):468-74.
55. Xavier LGdO. Tratamento de superfície em peças de titânico de grau medicinal [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2015.
56. Eaton P, West P. *Atomic Force Microscopy*: OUP Oxford; 2010.
57. Orriss IR, Taylor SE, Arnett TR. Rat osteoblast cultures. *Methods Mol Biol.* 2012;816:31-41.
58. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
59. Blake MS, Johnston KH, Russell-Jones GJ, Gotschlich EC. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem.* 1984;136(1):175-9.

60. Lin TH, Yang RS, Tang CH, Wu MY, Fu WM. Regulation of the maturation of osteoblasts and osteoclastogenesis by glutamate. *Eur J Pharmacol.* 2008;589(1-3):37-44.
61. Mendes RM, Silva GA, Caliari MV, Silva EE, Ladeira LO, Ferreira AJ. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Sci.* 2010;87(7-8):215-22.
62. Zar JH. *Biostatistical Analysis*: Prentice Hall; 2010.
63. Kohal RJ, Bächle M, Renz A, Butz F. Evaluation of alumina toughened zirconia implants with a sintered, moderately rough surface: An experiment in the rat. *Dent Mater.* 2016;32(1):65-72.
64. Boussein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldborg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010;25(7):1468-86.
65. van Oirschot BA, Alghamdi HS, Närhi TO, Anil S, Al Farraj Aldosari A, van den Beucken JJ, et al. In vivo evaluation of bioactive glass-based coatings on dental implants in a dog implantation model. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(1):21-8.
66. Horie M, Nishio K, Kato H, Endoh S, Fujita K, Nakamura A, et al. Evaluation of cellular influences caused by calcium carbonate nanoparticles. *Chem Biol Interact.* 2014;210:64-76.
67. Wall I, Donos N, Carlqvist K, Jones F, Brett P. Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro. *Bone.* 2009;45(1):17-26.
68. Teng FY, Ko CL, Kuo HN, Hu JJ, Lin JH, Lou CW, et al. A comparison of epithelial cells, fibroblasts, and osteoblasts in dental implant titanium topographies. *Bioinorg Chem Appl.* 2012;2012:687291.

ANEXOS E APÊNDICES

1. Aprovação da comissão de ética no uso de animais



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Allyson Nogueira Moreira ,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto TITÂNIO COM SUPERFÍCIE MODIFICADA POR BIOVIDRO: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO BIOLÓGICA IN VITRO E EM MODELO ANIMAL, submetido a esta comissão pelo protocolo 350 / 2013, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 17/02/2014.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 17/02/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O CURSO

Captação de recursos em agências de fomento

1. Aprovação do projeto: Titânio com superfície modificada por biovidro: produção, caracterização química, avaliação biológica in vitro e em modelo animal junto a FAPEMIG (Processo Nº: APQ-00542-14) com captação de verba no valor total de R\$ 49.801,18.

Processo seletivo

2. Aprovação em processo seletivo do Centro Universitário Newton Paiva para o cargo de Professor Adjunto I no curso de Odontologia.

Artigos completos publicados em periódicos

1. BARROS, VINICIUS DE MAGALHÃES; COSTA, NATÁLIA RAFAELA DE ASSIS ; MARTINS, PAULO HENRIQUE FONSECA ; VASCONCELLOS, WALISON ARTHUSO; DISCACCIATI, JOSÉ AUGUSTO CÉSAR ; MOREIRA, ALLYSON NOGUEIRA. Definitive Presurgical CAD/CAM-Guided Implant-Supported Crown in an Esthetic Area. Brazilian Dental Journal, v. 26, p. 695-700, 2015.

Artigos completos enviados para publicação em periódicos

1. FONTOURA, DIEGO CUNHA; BARROS, VINICIUS DE MAGALHÃES; DE MAGALHÃES, CLÁUDIA SILAMI; VAZ, RICARDO RODRIGUES; MOREIRA, ALLYSON NOGUEIRA. Evaluation of vertical misfit of CAD/CAM implant-supported titanium and zirconia frameworks. Brazilian Dental Journal.
2. VAZ, RICARDO RODRIGUES; BARROS, VINICIUS DE MAGALHÃES; FONTOURA, DIEGO CUNHA; ANTUNES, ALBERTO NOGUEIRA DA GAMA; MOREIRA, ALLYSON NOGUEIRA. Case Report: Narrow implant as minimal invasive rehabilitation. Journal of Prosthodontic Research.

Resumos publicados em anais de congressos

1. BARROS, V.M.; FONTOURA, D. C. ; DISCACCIATI, J. A. C. ; VASCONCELLOS, W. A. ; OLIVEIRA JUNIOR, C. S. ; VAZ, R. R. . Comparison of vertical misfit of fixed implant frameworks: conventional casted X CNC milled. In: Encontro do Grupo Brasileiro de Materiais Dentários, 2013, Piracicaba. Brazilian Journal Of Oral Science, 2013. v. 12. p. 266-266

2. FONTOURA, D. C. ; BARROS, V.M.; MAGALHÃES, C. S.; MOREIRA, A. N. Vertical misfitofimplant frameworks producedby CAD/CAM system comparedtotwocastedandwelded systems. In: 50º encontro GBMD, 2014, Pelotas - RS. AppliedAdhesion Science, 2014. p. 44-44.
3. BARROS, V.M.; DOMINGUES, R. Z. ; FERREIRA, A. J. ; QUEIROZ JUNIOR, C. M. ; SA, M. A. ; MAGALHAES, C. S. ; VASCONCELLOS, W. A. ; MOREIRA, A. N. . Avaliação biológica in vitro do titânio com superfície bioativa de fosfato de cálcio. In: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2016, Campinas. Brazilian Oral Research, 2016. v. 30. p. 350-350.
4. VASCONCELLOS, W. A. ; BARROS, V.M. ; MOREIRA, R. A. ; FERREIRA, A. J. ; SA, M. A. ; QUEIROZ JUNIOR, C. M. ; DOMINGUES, R. Z. ; MOREIRA, A. N. Osteoblastos em contato com uma superfície bioativa de titânio revestida por fosfato de cálcio: uma avaliação por microscopia eletrônica. In: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2016, Campinas. Brazilian Oral Research, 2016. v. 30. p. 350-350.

Resumos aceitos para apresentação e publicação em anais de congressos

1. IADR 2017: Abstract Control ID: 2635275. BARROS, VINICIUS DE MAGALHÃES; VASCONCELLOS, WALISON ARTHUSO; DOMINGUES, R. Z. ; FERREIRA, A. J.;MAGALHAES, C. S. ; MOREIRA, A. N.In Vitro Evaluationof a Bioactive Glass Coating for Titanium.

Revisão de artigo

1. Revisor Ad Hoc periódico PLOS ONE. Artigo: Gender difference in associations between chronic temporomandibular disorders and general quality of life in Koreans: A cross-sectional study (PONE-D-15-23115R1).