

**Influência de Tratamentos Superficiais Sobre Chapas de Titânio na Osteogênese
em Culturas de Células com Origem na Medula Óssea Humana**

Marilia Garcia Diniz

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Aprovada por:

Prof. Glória de Almeida Soares, D.Sc.

Prof. Maria Helena Raposo Fernandes, Ph.D.

Prof. Lais de Carvalho, D.Sc.

Prof. Ericksson Rocha e Almendra, D.Sc.

Prof. Ivan Guillermo Solórzano Naranjo, Ph.D.

Prof. Alexandre Malta Rossi, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

AGOSTO DE 2001

DINIZ, MARILIA GARCIA

Influência de Tratamentos Superficiais
Sobre Chapas de Titânio na Osteogênese
em Culturas de Células com Origem na
Medula Óssea Humana

[Rio de Janeiro] 2001

VIII, 109 p., 29,7 cm (COPPE/UFRJ,
D.Sc., Engenharia Metalúrgica e de Mate-
riais, 2001)

Tese – Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE

1. Microtopografia
2. Osteogênese
3. Tratamentos superficiais mecânicos e químicos
4. Cultura celular
5. Caracterização de superfícies
6. Caracterização biológica

I. COPPE/UFRJ I I. Título (série)

AGRADECIMENTOS

Ao suporte financeiro dado pelas agências CNPq, Capes, Faperj e FUJB;

Às orientadoras, Professoras Glória de Almeida Soares e Maria Helena Raposo Fernandes, pelo dedicado apoio incondicional;

Ao PEMM, pelo suporte técnico e operacional;

À CELMA – GE, pelo jateamento das chapas de titânio;

Ao Laboratório de Engenharia Mecânica e ao Laboratório de Engenharia Sanitária da UERJ, pelo suporte técnico operacional;

Ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto;

Às fiéis colaboradoras: Maria João Coelho, Cláudia Marina Martins e Márcia Sader.

Aos meus pais, Luiz Diniz (*in memoriam*) e Dalva Garcia Diniz, por uma vida inteira.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção de grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

**INFLUÊNCIA DE TRATAMENTOS SUPERFICIAIS SOBRE CHAPAS DE TITÂNIO
NA OSTEOGÊNESE EM CULTURAS DE CÉLULAS COM ORIGEM NA MEDULA
ÓSSEA HUMANA**

Marilia Garcia Diniz

Agosto / 2001

Orientadores: Glória de Almeida Soares

Maria Helena Raposo Fernandes

Departamento: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Foram preparadas amostras de titânio com diferentes rugosidades (R_a) e morfologias superficiais, através da combinação de tratamentos mecânicos (lixamento, com lixas metalográficas de SiC ou jateamentos abrasivos com partículas de dióxido de alumínio com granulometrias de $65\mu\text{m}$ ou $250\mu\text{m}$) e químicos (ataques com soluções à base de ácido sulfúrico / ácido clorídrico ou à base de ácido fluorídrico). Foi feita uma avaliação do comportamento biológico de culturas de osteoblastos com origem na medula óssea humana incubadas sobre as superfícies preparadas. A solução à base de ácido fluorídrico foi mais efetiva que a solução à base de ácido sulfúrico / clorídrico na obtenção de uma superfície homoganeamente rugosa e na eliminação das partículas contaminantes de alumínio geradas pelo processo de jateamento abrasivo. Células da medula óssea cultivadas sobre os diferentes substratos de titânio, apresentaram um modelo de comportamento similar durante as etapas de ligação e espalhamento (adesão). As células se proliferaram muito bem sobre todas as superfícies testadas e o crescimento celular foi observado durante aproximadamente de duas a três semanas. As amostras tratadas com solução à base de ácido fluorídrico apresentaram maior atividade da fosfatase alcalina. Somente os materiais submetidos aos jateamentos abrasivos seguidos de ataques com soluções ácidas, levaram as culturas com origem na medula óssea humana até a mineralização da matriz extracelular. O melhor comportamento biológico foi obtido para as culturas incubadas sobre as amostras jateadas e submetidas ao ataque químico à base de ácido fluorídrico, o que pode estar relacionado às características destas superfícies que apresentaram-se com microtopografia homoganeamente rugosa.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

**EFFECT OF SURFACE TREATMENTS ON TITANIUM SHEETS ON THE
OSTEOGENESIS IN HUMAN BONE MARROW CELL CULTURES**

Marilia Garcia Diniz

August / 2001

Advisors: Glória de Almeida Soares

Maria Helena Raposo Fernandes

Department: Metallurgical and Materials Science

Titanium samples of different roughness (R_a) and morphology were prepared using a combination of mechanical (grinding with SiC paper or blasting with aluminum oxide particles with $65\mu\text{m}$ or $250\mu\text{m}$) and chemical (attack with a sulfuric acid based solution or a hydrofluoric acid based solution) treatments. The biological performance of the prepared surfaces was evaluated using human bone marrow osteoblastic cell cultures. Mechanical treated samples presented different R_a values and surface morphology. The hydrofluoric acid based solution was more effective than the sulfuric acid based solution in smoothing titanium surface and also in eliminating aluminum contamination resulting from the blasting process. Bone marrow cells seeded on the different titanium samples showed a similar pattern of behavior during cell attachment and spreading. Cells proliferated very well on all the titanium surfaces and cell growth was observed during approximately two to three weeks. The samples treated with the hydrofluoric acid based solution presented higher alkaline phosphatase activity. Only the blasted samples treated with the acid solutions allowed seeded bone marrow cells to form a mineralized extracellular matrix. The best biological performance was found in the blasted samples treated with the hydrofluoric acid based solution, which could be related to the characteristic microtopography of these samples that presented a homogeneous and smooth roughness.

ÍNDICE

	Página:
I – INTRODUÇÃO	09
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
II.1 O TITÂNIO COMO OPÇÃO PARA IMPLANTOLOGIA	12
II.2 OS TRATAMENTOS SUPERFICIAIS	13
II.3 A SUPERFÍCIE E O COMPORTAMENTO BIOLÓGICO	16
II. 4 A INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA	17
II.5 A INFLUÊNCIA DA MICROTOPOGRAFIA	21
II. 5.1 AS FAIXAS DE RUGOSIDADE ADEQUADAS	23
II. 5.2 A ORIENTAÇÃO PREFERENCIAL DAS CÉLULAS	24
II. 5.3 CÉLULAS MESENQUIMAIS COMO PRECURSORAS	25
II. 5.4 SISTEMAS COM LINHAS CELULARES X SISTEMAS COM CÉLULAS HUMANAS NORMAIS	26
II. 5.5 OSTEOBLASTOS COM ORIGEM NA MEDULA ÓSSEA HUMANA	28
II. 5. 6 ADESÃO	28
II. 6 AS INFLUÊNCIAS CONJUNTAS DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MICROTOPOGRAFIA	29
II. 7 A CARACTERIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO	30
II.7.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	32
II.7.2 A ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS POR RAIOS-X	33

II.7.3 PERFILOMETRIA	34
II. 7.4 ÂNGULO DE CONTATO	35
III – MATERIAIS E MÉTODOS	38
III. 1 PREPARAÇÃO DAS SUPERFÍCIES	38
III. 2 CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES	40
III. 2.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	41
III. 2.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	41
III. 2.3 DETERMINAÇÃO DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL	41
III.2.4 MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO	42
III. 3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA <i>IN</i> <i>VITRO</i>	42
III. 3.1 CULTURAS CELULARES	42
III. 3.2 MORFOLOGIA CELULAR	43
III. 3.3 MÉTODOS BIOQUÍMICOS	44
IV – RESULTADOS	47
IV. 1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ENERGÉTICA DAS SUPERFÍCIES	47
IV. 1.1 MICROTOPOGRAFIA	47
IV. 1.2 RUGOSIDADE	50
IV.1.3 ÂNGULOS DE CONTATO E TENSÕES SUPERFICIAIS CRÍTICAS	51
IV. 2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS SUPERFÍCIES	52
IV.2.1 EDS	52
IV. 2.2 XPS	53
IV.3 TESTES BIOQUÍMICOS	63

IV. 3.1 VIABILIDADE / PROLIFERAÇÃO CELULAR	63
IV.3.2 – ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA	64
IV.4 MORFOLOGIA CELULAR	65
V – DISCUSSÃO	72
V.1 CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL DOS MATERIAIS	72
V.2 O COMPORTAMENTO BIOLÓGICO SOBRE AS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO	78
V.2.1 CULTURAS DE CONTROLE	79
V.2.2 CULTURAS SOBRE AS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO	82
V.2.2.1 A ADESÃO CELULAR SOBRE AS DIFERENTES SUPERFÍCIES	82
V.2.2.2 A VIABILIDADE CELULAR / PROLIFERAÇÃO E A ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA	84
V.2.2.3 A FORMAÇÃO DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO	90
V.3 O EFEITO DA MICROTOPOGRAFIA SOBRE A OSTEOGÊNESE	91
V.4 O EFEITO DE POSSÍVEIS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO PROVOCADAS PELOS ATAQUES ÁCIDOS	95
VI – CONCLUSÃO	98
APÊNDICE A	a
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do tecido celular em torno de um implante para reposição de perda óssea permanente, envolve uma elaborada estratégia que depende de muitos fatores, dentre eles, as propriedades da superfície do implante escolhido, incluindo sua micromorfologia ou microtopografia, composição química, rugosidade, energia superficial, molhabilidade e etc. Estabilidades estruturais e funcionais entre o tecido ósseo vivo e a superfície dos implantes pode significar uma garantia de seu sucesso e, neste aspecto, a utilização de implantes tais como os de titânio de pureza comercial possuem uma já comprovada biocompatibilidade que inclui boas propriedades mecânicas e excelente biotolerância.

Os implantes dentários são os mais conhecidos e bem sucedidos exemplos desta situação que também utilizam ligas de Ti-Al-V. Em alguns casos, as opções de recobrimento dos implantes metálicos com cerâmicos ou vidros bioativos tem mostrado bons resultados de osteointegração. Os cerâmicos à base de fosfatos de cálcio possuem uma forte semelhança com a hidroxiapatita biológica, o mineral mais importante na constituição do tecido ósseo [VROUWENVELDER et al., 1993; MARTIN et al., 1995].

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material intercelular calcificado, a matriz óssea. Das células que formam o tecido ósseo, os osteoblastos são os produtores da parte orgânica da matriz [HANCOX, 1972]. Os osteoblastos mostram-se sensíveis aos parâmetros relacionados à topografia gerada pelos diferentes acabamentos superficiais encontrados em uma considerável quantidade de implantes atualmente comercializados, porém, a procura de superfícies que otimizem respostas biológicas celulares tais como adesão, proliferação, diferenciação, adequada produção de matriz intracelular e extracelular, a calcificação desta última, tem motivado estudos que buscam a compreensão e melhorias nas interações implante – tecido ósseo, não só nas etapas iniciais de cicatrização, mas também em mais longo prazo [BRUNETTE et al., 1999; ANSELME et al., 2000a].

Assim é que com o intuito de acelerar e/ou melhorar as citadas interações, os implantes podem sofrer operações para modificação da superfície, envolvendo tratamentos mecânicos de jateamentos com óxidos abrasivos, associados ou não, a tratamentos químicos com soluções ácidas ou básicas. Uma adequada

microtopografia pode ser capaz de induzir a osteogênese e uma boa neo-formação óssea em torno do implante, porém, uma condição ideal ainda não é conhecida, nem suas amplitudes e organizações. Infelizmente, tais informações são de difícil obtenção por testes *in vivo* onde a interface implante–tecido é dinâmica e complexa, portanto, testes *in vitro* tornam-se necessários como etapas complementares essenciais ao conhecimento dos efeitos das superfícies dos materiais utilizados como implantes sobre as respostas celulares [CASTELLANI et al., 1999; ANSELME et al., 2000b]. Os modelos *in vitro* permitem um exame temporal mais simples de influências específicas sobre uma determinada linhagem celular, tais como as respostas biológicas dadas por osteoblastos humanos quando em contato com a superfície do titânio.

A maioria dos trabalhos *in vitro* que estudam a influência da microtopografia de biomateriais, utilizam linhas celulares bem caracterizadas para culturas de células e que exibem numerosas características de osteoblastos. Estas células não são osteoblastos humanos saudáveis e normais e, além disso, nem sempre estas culturas de tecidos são levadas até a mineralização ou até tempos suficientes para que as células alcancem maturidade, mostrando uma cinética característica para os estágios de diferenciação em resposta ao tipo de superfície existente na interface células / material [CASTELLANI et al., 1999].

As respostas dos osteoblastos quanto ao aspecto acabamento superficial do titânio não recoberto, são dependentes do grau e estágio de maturidade do tecido e, portanto, considerar que um certo tipo de superfície promove uma boa adesão não garante que a mesma promova a diferenciação e mineralização adequada da matriz extracelular numa interface sempre ativa entre biomaterial e tecido vivo. Espera-se que um implante produza respostas de remodelação no tecido ósseo vivo desde sua cicatrização até a osteointegração, passando por todas as fases do desenvolvimento celular [MARTIN et al., 1995; DELIGIANNI et al., 2001].

Em relação aos sistemas de cultura, considera-se que as células de origem humana ofereçam respostas mais próximas à realidade do que ocorre *in vivo* e, neste aspecto, as células mesenquimais obtidas da medula óssea humana de doadores saudáveis, mostram-se capazes de diferenciarem-se em osteoblastos, sob a presença de fatores que enriquecem os meios de cultura, tais como a dexametasona [FERRAZ et al., 1999].

O objetivo deste estudo foi analisar a morfologia e o comportamento funcional de osteoblastos (viabilidade celular / proliferação, diferenciação pela atividade da fosfatase alcalina - “alkaline phosphatase activity” ou “ALP activity” - e da capacidade de mineralização da matriz extracelular) recrutados da medula óssea humana e semeados sobre chapas de titânio não recoberto e com diferentes acabamentos superficiais, obtidos por meio da combinação de lixamentos ou de jateamentos abrasivos com óxido de alumínio com duas diferentes granulometrias e ataques químicos com soluções à base de ácido sulfúrico e ácido clorídrico ou solução à base de ácido fluorídrico. Foram geradas 9 condições superficiais distintas e estes resultados foram comparados com os resultados obtidos em controles feitos em culturas realizadas em paralelo e sob as mesmas condições, em placas plásticas padrão para cultura de tecidos.

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II. 1 O TITÂNIO COMO OPÇÃO PARA IMPLANTOLOGIA

O titânio é o material contemporâneo de escolha mais comum para implantes utilizados em cirurgias orais e crânio-faciais devido a sua já reconhecida aceitação biológica pelo tecido ósseo, em situações onde a substituição parcial deste tecido pelo implante possui um caráter permanente [BRÄNEMARK, 1983].

A elevada biocompatibilidade do titânio é garantida, em parte, pela camada de óxido protetora e estável (2 – 6nm de espessura) que se forma na superfície do implante quando em contato com fluidos corpóreos e que, presume-se, auxilie nas ligações existentes na interface implante / tecido ósseo. A composição química e a estrutura da camada superficial de óxido pode ser, na maioria das vezes, alterada por técnicas de tratamento superficial do metal [KELLER et al., 1990 e 1994].

Os métodos de preparação da superfície de um implante podem de modo significativo alterar suas propriedades superficiais e conseqüentemente as respostas biológicas que ocorrem nesta região de interface, particularmente durante o período de cicatrização que se segue ao processo cirúrgico.

Os eventos celulares que ocorrem nas etapas iniciais da formação do tecido ósseo ao redor do implante são fortemente influenciados pelas propriedades de sua superfície. Além disso, as condições superficiais do implante na interface gerada implante / tecido ósseo podem sofrer alterações ao longo de seu tempo de vida útil no organismo, sob efeito de esforços mecânicos e sob a influência de um processo de renovação biológica local dinâmica e constante. Portanto, a superfície do implante, variável ao longo do tempo, irá influenciar o comportamento biológico celular local constantemente.

A compreensão dos mecanismos que ocorrem durante o processo de surgimento de um tecido ósseo ao redor de um implante, isto é, a osteogênese, mesmo que sejam elementares, é uma das maiores barreiras para o desenvolvimento de uma nova e avançada geração de biomateriais utilizados em projetos de implantes. A exploração deste fenômeno, com a finalidade de melhorar o desenvolvimento de produtos e processos, envolve o cruzamento de conhecimentos, uma multidisciplinaridade e uma

interdisciplinaridade, numa comunicação de métodos que buscam resultados eficientes.

Uma ilustração esquemática da situação que geralmente pode ser encontrada na interface biomaterial / tecido ósseo, após passado algum tempo da inserção do implante, é apresentada na Figura II.1. A superfície do implante é envolvida com uma camada de material extracelular, incluindo água, íons e biomoléculas, isto é, substâncias essenciais para a sobrevivência e construção dos tecidos. Esta camada se comporta, de certo modo, como um meio no qual as células se intercomunicam e que as separa do contato direto com a superfície “estranha” do biomaterial. A referida situação não é estática, isto é, a interface evolui com o tempo e, portanto, os estudos dos eventos que se desenrolam devem incluir aspectos relativos aos períodos iniciais (osteogênese) e de períodos mais avançados após colocação do implante.

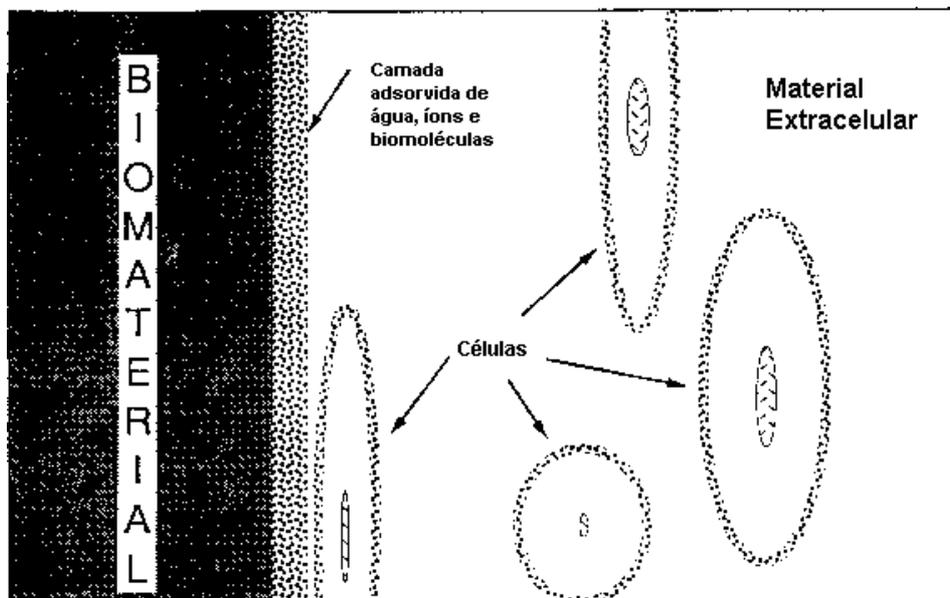


Figura II.1 – Esquema da interface gerada entre o biomaterial e o sistema biológico após algum tempo da inserção do implante. Dependendo da natureza e da estrutura extracelular gerada nesta região, as células podem ser estimuladas de maneira diferente, mesmo que não exista um contato direto entre elas e a superfície do implante.

II. 2 OS TRATAMENTOS SUPERFICIAIS

Implantes endoósseos são normalmente fabricados em titânio comercialmente puro ou em ligas Ti-Al-V. As ligas de titânio, com limites de resistência à tração maiores (da ordem de 900MPa no estado recozido), são empregadas preferencialmente em

implantes com diâmetro inferior a 4mm, como forma de garantir a resistência mecânica adequada do material [MOORE e OSHIDA, 1995].

Atualmente, são fabricados e comercializados diversos tipos, abrangendo projetos com variações de geometria e acabamentos superficiais. Os tratamentos superficiais podem ser divididos em dois grandes grupos; um deles é o grupo dos implantes recobertos, por exemplo, com substâncias ditas bioativas ou não. Dentre as substâncias bioativas, se destacam os fosfatos de cálcio que possuem composição similar ao constituinte mineral do tecido ósseo [DE GROOT, 1998].

A modificação da superfície dos implantes por meio de recobrimentos biocerâmicos tem mostrado uma indução na formação de apatita biológica, como resultado da dissolução, precipitação e reações de troca iônica no desenvolvimento fisiológico de tecido ósseo. A hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HA), um fosfato de cálcio cerâmico, tem sua utilização como implante limitada às aplicações submetidas a menores esforços mecânicos, bem como outros materiais cerâmicos similares [FERRAZ et al., 1999; MATSUURA et al., 2000].

Os recobrimentos têm apresentado vantagens e desvantagens, pois, apesar do comprovado favorecimento da osteointegração nos estágios iniciais do processo, um progressivo enfraquecimento nas ligações na interface implante / recobrimento podem levar à dissolução do recobrimento ou descolamento do mesmo com o tempo [YAN e DAVIES, 1998]. A combinação das propriedades do titânio como elevada resistência à corrosão, elevada relação resistência-peso e simplicidade de fabricação com a bioatividade da hidroxiapatita, tem levado à obtenção de bons resultados.

Normalmente se objetiva a produção de recobrimentos pouco espessos visando aumentar a adesão do recobrimento ao substrato. A espessura ideal de camada de hidroxiapatita sobre implantes de titânio não está ainda estabelecida e sempre pode variar conforme o processo utilizado para o recobrimento, tais como os de deposição por eletroforese e eletro-co-deposição que geram espessuras menores que as observadas por aspersão a plasma que podem chegar até 100 μm ; assim como ainda não é conhecido o tempo em que o recobrimento deve se manter estável sobre o implante após inserção no corpo humano [PRADO DA SILVA, 1999]. Além de camadas menos espessas serem mais rapidamente reabsorvidas pelo tecido ósseo que cresce ao redor do implante, outro ponto que deve ser considerado é a resistência mecânica da camada. Segundo PRADO DA SILVA (1999), alguns trabalhos relatam

que, camadas mais finas possuem maior resistência mecânica quando comparadas a camadas espessas. Entretanto, a maioria dos fabricantes de implantes prefere espessuras da ordem de 50 μ m.

O outro grupo de tratamentos de modificação da superfície dos implantes envolve a criação de uma microtopografia que favoreça a osteointegração com base no ancoramento mecânico do implante ao osso. Esta superfície pode ser gerada por meio de jateamento com óxidos abrasivos ou usinagem, associados, ou não, a tratamentos químicos com soluções ácidas ou básicas, ou ainda através de recobrimentos por titânio num processo de aspersão térmica conhecido como plasma “spray” (“titanium plasma spray”, TPS). Os jateamentos abrasivos não somente afetam a rugosidade da superfície, mas também, podem remover contaminantes da superfície metálica e aumentar a sua reatividade. Por outro lado, o emprego de partículas abrasivas com composição química diferente da do implante, pode alterar sua composição química superficial e afetar sua biocompatibilidade.

O Al₂O₃ (alumina) é utilizado como material para jateamentos abrasivos, a escolha baseada em menores custos e uma efetiva alteração da microtopografia superficial, apesar de sempre deixar resíduos contaminantes na superfície do implante considerados de difícil remoção, quando não praticamente impossível [SALGADO et al., 1998].

Submeter o titânio e suas ligas a tratamentos químicos superficiais na procura de condições que induzam melhores respostas biológicas, tal como uma maior osteointegração ao implante, já tem sido o objetivo de alguns trabalhos. YAN e DAVIES (1998) testaram em ratos, isto é, *in vivo*, implantes de titânio submetidos a um certo ataque químico superficial ácido (Implantes OSSEOTITE[®]), associados ou não, a um ataque químico superficial com solução à base de hidróxido de sódio (NaOH) seguido de um tratamento térmico. Os resultados sugerem que a microtopografia dos implantes submetidos à seqüência completa de tratamentos com solução ácida (OSSEOTITE[®]), solução básica de hidróxido de sódio e tratamento térmico, obtiveram os melhores resultados de osteointegração com uma maior área de contato direto entre tecido ósseo e os implantes após 12 semanas da colocação dos mesmos.

NISHIGUCHI et al. (1998) num trabalho semelhante, testaram diversos tratamentos químicos com soluções básicas de hidróxido de sódio, associados ou não, a tratamentos térmicos em três diferentes ligas de titânio implantadas em coelhos por

até 16 semanas: Ti-6Al-4V, Ti-6Al-2Nb-1Ta e Ti-15Mo-5Zr-3Al. Os resultados também sugerem que esta associação de tratamentos superficiais químicos com tratamentos térmicos potencializa a osteointegração, porém, em ambos os trabalhos citados, nenhuma das superfícies foi caracterizada para uma avaliação de suas propriedades e reais diferenças.

Um tratamento químico superficial em duas etapas, sobre titânio de pureza comercial, é proposto por WEN et al. (1998); uma primeira etapa com solução à base de ácido clorídrico e ácido sulfúrico e uma segunda etapa com solução à base de hidróxido de sódio. Os resultados mostraram que os tratamentos em duas etapas foram capazes de gerar superfícies de óxido de titânio com microporosidades que aparentemente induziam a formação mais rápida de uma aderente camada de fosfato de cálcio sobre as superfícies testadas *in vitro* num processo para deposição de cálcio em solução aquosa supersaturada sobre as mesmas.

Alguns tratamentos químicos superficiais são utilizados especificamente para a remoção de contaminantes oriundos do processo de fabricação dos implantes ou da preparação clínica para a cirurgia e, geralmente, estes métodos englobam ataques com soluções à base de ácidos fluorídricos (HF), ácidos sulfúricos (H₂SO₄), ácidos nítricos (HNO₃), ácidos fosfóricos (H₃PO₄), ácidos orgânicos, oxidação anódica com correntes elétricas em meios ácidos e técnicas de nitretação da superfície de titânio.

Segundo KAWAHARA (1995), a utilização de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em meio às soluções à base de ácido fluorídrico, permite a obtenção de superfícies mais estáveis, através da imediata oxidação dos sítios reativos que ficam expostos sobre a superfície de titânio quando submetido ao ataque do referido ácido.

II. 3 A SUPERFÍCIE E O COMPORTAMENTO BIOLÓGICO

A natureza da superfície de um implante pode ser descrita em termos de sua composição química, energia superficial e morfologia. Muitos artigos e livros tem sido publicados sobre a caracterização de superfícies de biomateriais e aplicado estas informações no seu desenvolvimento [RATNER et al., 1987]. Geralmente, os efeitos da composição química e da microtopografia, em situações *in vitro* ou *in vivo*, são considerados separadamente, com poucos autores considerando estes efeitos simultaneamente [ANSELME et al., 2000a].

É quase um consenso que no caso de osteoblastos, acabamentos superficiais rugosos são preferíveis às superfícies polidas, e não obstante, o titânio esteja sendo amplamente utilizado em diferentes aplicações médicas nos últimos 30 anos, o fator e mecanismo que controlam as respostas biológicas ao redor do implante continuam pouco compreendidos [DEGASNE et al., 1999] e a microtopografia ideal não é conhecida, bem como uma precisa faixa também ideal de rugosidade. Estudos *in vivo* mostram que superfícies de titânio polidas induzem o crescimento de tecido fibroso ao redor dos implantes, ao invés de tecido ósseo [MARTIN et al., 1995]. Em contraste aos osteoblastos, células epiteliais somente se aderem às superfícies de titânio muito polidas [BOYAN et al., 1996]. Assim, devido ao ainda desconhecimento da superfície de microtopografia ideal para os implantes, os tratamentos superficiais de usinagem, ataques com soluções ácidas ou básicas, eletropolimento, oxidação anódica, jateamento abrasivo, recobrimentos com “plasma-spraying” e etc., continuam gerando superfícies de titânio com muitas diferenças e que merecem investigações e testes do comportamento biológico dos osteoblastos [ANSELME et al., 2000a].

A superfície do material na interface implante / tecido, possui um papel crucial nas interações biológicas, principalmente por ser uma região quase sempre diferente em morfologia e composição química em relação ao tecido circundante como um todo (“bulk”), e que, quando não libera substâncias tóxicas ou biologicamente ativas, suas características micromorfológicas irão governar as respostas biológicas. Os arranjos de macromoléculas que envolvem as células também resultam de suas interações com a superfície do implante e irão influenciar eventos como sua adesão, espalhamento sobre a superfície, produção de hormônios, fatores de crescimento, comunicação entre células (através de taxas de componentes químicos), atividades celulares locais ou nas circunvizinhanças, proliferação e etc. [MARTIN et al., 1995]. Assim, uma complicada rede de influências se estabelece como resultado das interações entre a superfície do implante e o tipo de tecido e de fluidos envolventes presentes.

II. 4 A INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A influência da composição química da superfície tem sido examinada em testes de culturas celulares sobre titânio comercialmente puro, ligas de titânio, filmes de titânio, pós de ligas de titânio, vidros bioativos, hidroxiapatita, aços inoxidáveis e muitos outros; os resultados mostram que tanto para os metais quanto para os materiais utilizados como recobrimentos, o metabolismo celular e o seu comportamento

fenotípico são afetados por este parâmetro [VROUWENVELDER et al., 1993; MARTIN et al., 1995; SÄUBERLICH et al., 1999; ANSELME et al., 2000a].

Muitos são os aspectos biológicos celulares influenciados pela modificação da composição química superficial do implante, nos mais variados tipos de células, incluindo fibroblastos e osteoblastos. Estes últimos mostraram-se sensíveis às variações nas composições químicas superficiais de substratos feitos com materiais comumente utilizados em implantologia (Ti-6Al-4V, aço inoxidável 316L, hidroxiapatita, vidro bioativo), testados em culturas de osteoblastos isolados das abóbadas cranianas de fetos de ratos, nos aspectos de morfologia celular, proliferação e diferenciação [VROUWENVELDER et al., 1993].

Apesar de sua freqüente utilização, recentes estudos tem mostrado que a presença do vanádio associado ao alumínio nas ligas Ti-6Al-4V pode provocar desordens neurológicas devido a conhecida toxicidade do vanádio. As ligas Ti-6Al-7Nb e Ti-13Zr-13Nb tem sido investigadas na busca de possíveis soluções alternativas para a substituição da presença do vanádio e diminuição dos efeitos deletérios de toxicidade [BLENKINSOP, 1992; CANALE, 1996].

Quanto à morfologia celular, observou-se diferenças entre materiais que permitiam osteoblastos poligonais, com ondulações dorsais e numerosos filamentos que se estendiam sobre a superfície dos materiais em grandes grupamentos (“clusters”) e materiais em que os osteoblastos eram mais planos, sem ondulações dorsais e sem filamentos (“filopodia”), estando concentrados em pequenos grupos, provavelmente por um favorecimento micro-localizado. As geometrias mais esféricas, sem ondulações dorsais ou filopodia denotavam condições precárias das culturas osteoblásticas. Ao se considerar a influência da composição química do material, ou de qualquer outra propriedade da superfície sobre a morfologia de osteoblastos, o importante é que as observações sejam feitas nos períodos iniciais dos sistemas de culturas, pois, a formação de camadas celulares superpostas irá de algum modo mascarar os efeitos da superfície na geometria da célula ou em sua orientação.

Quanto ao aspecto proliferação e diferenciação, as composições químicas que favoreciam osteoblastos, apresentavam culturas que atingiam a confluência e significativamente mais expressivas fenotipicamente, onde a expressão do grau de diferenciação foi dada por uma relação entre a atividade da fosfatase alcalina (“Alkaline Phosphatase Activity”, ALP “activity”) - um marcador específico para

osteoblastos, relativo à atividade de uma enzima específica produzida por osteoblastos maduros, a fosfatase alcalina – e a quantidade de DNA contida nas culturas incubadas em períodos de 3, 6 e 8 dias. Este estudo mostrou um interessante aspecto de que os osteoblastos que cresciam sobre substratos metálicos com superfícies não recobertas apresentaram necessidade de tempos de cultura maiores para exibirem taxas significativas de ALP em testes *in vitro*, isto é, os osteoblastos levavam mais tempo para exibirem maturidade e para expressarem comportamento que os distinguísse em relação a outro tipo de célula qualquer; estabeleceu-se que testes que estudam sistemas de culturas osteoblásticas *in vitro* em substratos metálicos não recobertos devem ser mantidos por períodos mais longos de cultura, isto é, períodos maiores do que 8 dias, para demonstrarem estágios de adesão, proliferação e diferenciação.

Substâncias químicas liberadas pelos materiais, principalmente pelo aço inoxidável, geram complexos organometálicos que retardam a expressão dos osteoblastos ou até mesmo podem lhe causar a morte. Aços inoxidáveis contendo cromo, cobalto e níquel como elementos de liga, possuem graus de citotoxicidade variáveis; titânio e suas ligas são geralmente bem tolerados [VROUWENVELDER et al., 1993]. A incorporação de íons pela superfície pode provocar uma alteração na ligação e na ordem da distribuição das proteínas que envolvem as células e conseqüentemente em como elas irão ficar ligadas ao material e em como irão desempenhar suas funções biológicas. Por exemplo, a incorporação da fluorapatita nas superfícies de hidroxiapatita altera as ligações e as orientações das proteínas com cálcio que envolvem as células, na sua adesão à superfície do substrato [BOYAN et al., 1996].

A cinética do processo de adesão de células com origem na medula óssea de ratos mostrou-se susceptível às variações na composição química de superfícies de titânio, conforme mostram os resultados de ONG et al. (1995). Para substratos de titânio não recobertos, apresentando superfícies com dióxido de titânio (TiO_2) predominantemente amorfo e substratos de titânio recobertos com fosfato de cálcio, testes *in vitro* não mostraram diferenças significativas na população de células para todos os materiais testados, porém, a percentagem de proteína presente nas camadas celulares era significativamente maior para os materiais não recobertos até ao terceiro dia de incubação das culturas. Este comportamento foi, provavelmente, resultado das diferenças entre as composições químicas e estruturais das superfícies testadas.

Após as etapas de adesão sobre a superfície do biomaterial, os eventos subseqüentes também são influenciados e interdependentes, tais como a capacidade de espalhamento celular sobre a superfície e a citomorfologia resultante deste espalhamento, o que irá afetar sua futura expressão fenotípica, incluindo a proliferação e a formação da matriz extracelular e, finalmente, a possibilidade de mineralização da matriz extracelular, no caso de osteoblastos.

Processos de esterilização também podem alterar a composição química superficial dos implantes. Materiais implantados no corpo humano ou em animal, devem estar estéreis, pois, um processo infeccioso subseqüente pode causar sérios danos e até mesmo a morte. Ser estéril ou estar esterilizado é uma situação definida como a ausência de todo e qualquer organismo vivo, especialmente os micro-organismos, tais como bactérias, fungos e vírus.

Um dos primeiros métodos de esterilização utilizados para implantes foi a autoclavagem, a qual envolve a exposição do material a uma atmosfera saturada de vapor d'água sob pressão. O uso de temperaturas relativamente altas neste processo (121°C) pode, algumas vezes, ser um fator de impedimento na esterilização de materiais não metálicos e suas embalagens. Esta limitação levou ao desenvolvimento e utilização de métodos de esterilização com gás de óxido de etileno (EtO) e radiação ionizante (raios gama, aceleração de elétrons) [KOWALSKI e MORRISSEY, 1996].

Superfícies de titânio autoclavadas em meio vapor, expostas a atmosfera gasosa de óxido de etileno e imersas em puro álcool etílico, mostraram-se contaminadas por Fe e Cl, o que resultou em alterações no comportamento biológico *in vitro* de fibroblastos, incluindo a percentagem de células aderidas e o seu espalhamento, fatores observados para cada tratamento de esterilização utilizado [KELLER et al., 1990].

Certas técnicas de esterilização, tal como a autoclavagem em meio vapor, podem provocar efeitos deletérios no processo de integração entre tecidos e superfícies metálicas devido às possíveis contaminações superficiais por inorgânicos. Técnicas que incluem luz ultravioleta e radiação gama, reduzem o nível de contaminação de superfícies de titânio; resultados de testes *in vitro* mostraram que as respostas biológicas mais imediatas de linhas celulares osteoblásticas, como adesão e citomorfologia de até 2 horas de incubação, não foram prejudicadas por estes tratamentos de esterilização [KELLER et al., 1995].

II.5 A INFLUÊNCIA DA MICROTOPOGRAFIA

A microtopografia resultante do acabamento superficial de um implante, incluindo sua micromorfologia e rugosidade, pode significar a diferença entre seu sucesso ou catástrofe e muitos estudos de sistemas *in vitro* ou *in vivo* tentam estudar como a microtopografia de biomateriais afeta as respostas celulares.

A definição de superfície polida ou rugosa varia entre macro rugosidade (valores em milímetros), micro rugosidade (até valores micrométricos) e rugosidade nanométrica (valores em escala nanométrica). Muitos autores tem concentrado suas investigações em escalas micrométricas das superfícies de biomateriais, isto é, nas micro rugosidades e na micromorfologia das superfícies que irão resultar em sua microtopografia. A Figura II.2 apresenta, esquematicamente, as possíveis escalas de influência da topografia de um implante na osteointegração *in vivo* [WENNERBERG, 1996]; muitos estudos tem mostrado que espaçamentos de até 0,1mm são necessários para uma completa osteointegração, sem excluir, absolutamente, a importância da rugosidade superficial em escalas micrométricas ou nanométricas.

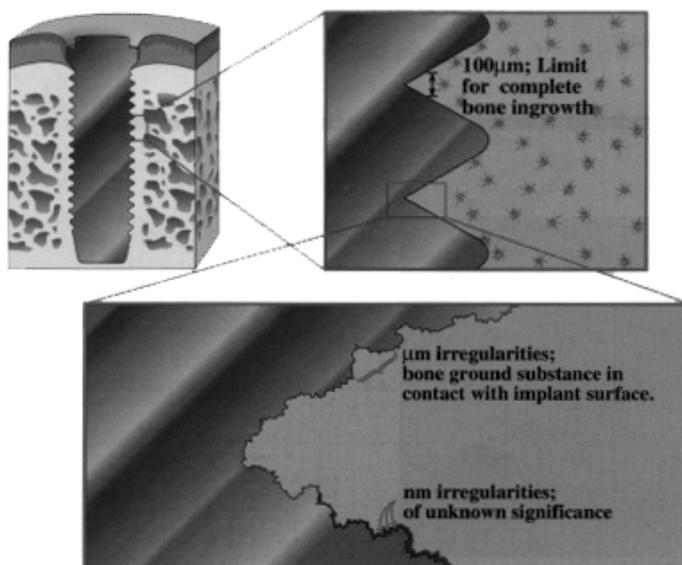


Figura II.2 - Esquema das possíveis escalas de influência da topografia de um implante na osteointegração, *in vivo* [WENNERBERG, 1996].

GRÖßNER-SCHREIBER e TUAN (1991) ao estudarem culturas de osteoblastos sobre discos de titânio polidos, rugosos e com poros, estes últimos, mostraram maiores taxas de produção de colágeno e capacidade de mineralização da matriz extracelular,

porém, o único método utilizado para a caracterização das superfícies foi a microscopia eletrônica de varredura.

BOWERS et al. (1992) investigaram a quantidade de células de linhas celulares osteoblásticas aderidas sobre superfícies de titânio com diferentes rugosidades. Foram encontradas maiores quantidades de células aderidas sobre as superfícies dos substratos mais rugosos, obtidos por jateamento abrasivo com dióxido de alumínio com granulometria média de $50\mu\text{m}$, quando comparados com as superfícies com morfologia superficial mais regular, produzidas por procedimentos mecânicos de polimento. Os valores de rugosidades médias das superfícies avaliadas variaram entre $R_a = 0,14 - 1,15\mu\text{m}$.

Os resultados de KELLER et al. (1994) vieram dar reforços aos resultados obtidos por BOWERS et al. acima mencionados, pois, células osteoblásticas de linhagens celulares cultivadas sobre superfícies de titânio e também da liga Ti-6Al-4V, proliferaram mais sobre as superfícies mais rugosas, com maior número de células aderidas quando comparadas com superfícies menos rugosas. Os valores de R_a investigados variaram na faixa de $0,03 - 0,9\mu\text{m}$.

Os efeitos sobre a proliferação, diferenciação e produção de matriz extracelular em culturas de linhas celulares MG63, cultivadas sobre discos de titânio com diferentes acabamentos superficiais, foram analisados por MARTIN et al. (1995). As linhas MG63 são obtidas por células originalmente isoladas de osteosarcoma humano e tem sido bem caracterizadas, apresentando numerosas peculiaridades osteoblásticas, incluindo avaliações de ALP. Entre as superfícies de titânio avaliadas, as mais rugosas (valores de rugosidade máxima de $19,68\mu\text{m}$, $21,90\mu\text{m}$ e $39,80\mu\text{m}$) mostraram-se inibidoras da adesão, da proliferação e da diferenciação, esta última, avaliada como função da atividade da fosfatase alcalina (ALP), exceto as superfícies com rugosidade máxima de $21,90\mu\text{m}$ onde os valores de ALP em 24 horas de incubação foram significativamente maiores que os encontrados para as culturas crescendo sobre a superfície plástica padrão para culturas celulares e que, neste caso, foi utilizada como controle positivo de comparação.

Os resultados obtidos por MARTIN et al. (1995) nos testes *in vitro* foram correlacionados com testes *in vivo*, onde o processo de calcificação sobre as superfícies mais rugosas em implantes colocados em tíbias de ratos foi prejudicado,

provavelmente devido à influência da microtopografia da superfície na produção de enzimas pelos osteoblastos e que possibilitam a calcificação da matriz extracelular, tal como a fosfatase alcalina. Uma análise cuidadosa revelou que, dentre as superfícies mais rugosas, a única que apresentou resultados de respostas biológicas satisfatórios, possuía uma regularidade na microtopografia, indicando que, não somente o parâmetro rugosidade, mas também os aspectos morfológicos da superfície são importantes no desempenho dos materiais, onde a maior síntese de colágeno e a melhor matriz extracelular foi encontrada para a superfície homogeneamente rugosa. Interessante também se notar que o processo de esterilização por autoclave utilizado por MARTIN et al. (1995) para os discos de titânio, apresentava somente um aumento na presença de carbono nas superfícies, não tendo, portanto, provocado contaminações com elementos indesejáveis ou que pudessem provocar efeitos deletérios aos seus testes *in vitro* ou *in vivo*, tal como as técnicas de esterilização por autoclavagem descritas em KELLER et al. (1990).

II. 5.1 AS FAIXAS DE RUGOSIDADE ADEQUADAS

A rugosidade é apenas um dos parâmetros que descrevem a morfologia de uma superfície e, pode-se dizer, que todas as superfícies possuem rugosidade em determinada escala. Normalmente, R_a ou rugosidade média, é o parâmetro mais amplamente especificado e medido para descrever e comparar as características de acabamentos superficiais [WHITEHOUSE, 1974].

Mesmo tentando-se isolar o efeito da rugosidade sobre o comportamento biológico de osteoblastos, pode-se dizer que a variedade de resultados já obtidos é incipiente, pois, não se busca somente uma faixa de rugosidade adequada, mas também a morfologia que lhe acompanhe. Superfícies numa mesma faixa de rugosidade média podem ter micromorfologias diferentes, graus distintos de organização, o que determinarão respostas distintas na adesão, organização celular, proliferação, diferenciação, etc.

Alguns trabalhos encontraram bons resultados para superfícies de titânio jateadas com rugosidades em torno de $1\mu\text{m}$, já outros, mostraram seus bons resultados em titânio jateado com rugosidades médias três a quatro vezes maiores, isto é, em torno de 3 - $4\mu\text{m}$. Também existem trabalhos que mostram seus piores resultados com titânio jateado entre 2 - $3\mu\text{m}$ e os melhores com superfícies lixadas com valores de R_a entre 0,2 - $0,3\mu\text{m}$ [LINCKS et al., 1998; DEGASNE et al., 1999; ANSELME et al., 2000a e b].

Alguns trabalhos tem avaliado com testes *in vivo*, o comportamento de implantes de titânio com diferentes rugosidades e que, removidos após algumas semanas do procedimento cirúrgico, mostram que existe uma rugosidade ideal na qual existe uma maior resistência oferecida pelo implante no processo de sua remoção da interface implante / tecido ósseo [WENNERBERG et al., 1996; ELIAS et al., 2000].

Cabe observar que valores de rugosidade obtidos por diversos trabalhos são de difícil comparação, uma vez que, dependem da escolha do tamanho de uma linha referencial para medição e do operador do equipamento utilizado para a caracterização. Assim, dependendo da escolha feita, uma mesma superfície pode ter valores de R_a bem distintos se forem medidos por equipamentos ou operadores diferentes.

CASTELLANI et al. (1999), concluíram que seus testes *in vitro* para osteoblastos com origem na medula óssea de ratos, cultivados sobre titânio com R_a entre 0,3 – 0,8 μ m, não confirmaram claramente os efeitos da rugosidade sobre a proliferação, diferenciação e calcificação destas culturas. Em parte, uma das causas entre esta variedade de resultados, é função do tipo de sistema estudado e do tipo de análise de cada autor, uma vez que, uns consideram que elevados valores proliferação já mostram bons resultados, já outros, mostram que pequenos valores de proliferação x elevados valores de atividade da fosfatase alcalina é que são considerados bons resultados. Espera-se que a confiabilidade de resultados cresça para quanto maior o número de variáveis estudadas no processo e que, um cruzamento destas informações, possa auxiliar na escolha de superfícies mais adequadas para o processo de osteointegração. Apesar de muito empenho, não raro, muitos trabalhos não apresentam os valores quantitativos de rugosidade gerados por tratamentos superficiais.

II. 5.2 A ORIENTAÇÃO PREFERENCIAL DAS CÉLULAS

Já são conhecidos alguns tipos de superfícies que possuem microtopografias que podem provocar a orientação preferencial das células. Tal efeito, dito “guia de contato” também ocorre em osteoblastos, principalmente em culturas não confluentes, onde ainda se permite a observação de células isoladas; colônias celulares mostram-se menos afetadas por esta orientação preferencial [MEYLE et al., 1995; WALBOOMERS et al., 1999].

Técnicas de microusinagem para a obtenção de ranhuras de dimensões e arranjos pré-determinados em diversos substratos utilizados em sistemas de culturas celulares, inclusive superfícies de titânio, mostraram que, não havendo descontinuidades pronunciadas sobre as mesmas, existem certas texturas e acabamentos superficiais que podem induzir a orientação celular com uma evidente influência em sua morfologia e conseqüentemente em seus comportamentos fenotípicos. Um ponto em comum nos estudos do fenômeno da orientação preferencial celular é de que, os efeitos de microtopografias pouco distintas sobre o comportamento biológico celular são de difícil avaliação [MEYLE et al., 1995]. Esta situação ficou evidente nos testes de OHGUSHI et al. (1996), onde os resultados de adesão e diferenciação (ALP) em culturas com origem na medula óssea de ratos, não mostraram diferenças significativas para substratos com rugosidades entre 0,2 – 0,8 μ m.

Algumas técnicas de microusinagem, utilizadas em superfícies de titânio, mostraram que pode-se aumentar a mineralização do tecido ósseo tanto *in vitro* quanto *in vivo* com uma orientação preferencial do tecido em ambas as situações, porém, a observação *in vitro* dos fenômenos envolvidos no processo é feita com maior facilidade [BRUNETTE e CHEHROUDI, 1999]. Regras bem estabelecidas e que poderiam prever como as células ósseas iriam se comportar, em respostas às superfícies na interface com o biomaterial numa situação *in vitro*, ainda não podem garantir que seus princípios sejam válidos *in vivo*, dado o grande número de variáveis nesta última situação.

II. 5.3 CÉLULAS MESENQUIMAIS COMO PRECURSORAS

Durante a formação ou renovação do tecido ósseo ao redor do implante, há necessidade de um constante recrutamento de células precursoras de osteoblastos; sua diferenciação em osteoblastos capazes de produzirem uma matriz extracelular não mineralizada (protéica) e de calcificarem esta matriz. Células mesenquimais têm se mostrado capazes de se diferenciarem em osteoblastos através da atuação de hormônios e de certos fatores, tais como o de crescimento, quando aplicados em quantidades controladas durante os estágios de cicatrização e de formação do tecido sobre o biomaterial. Os hormônios possuem importantes funções no controle do comportamento da expressão fenotípica das células recrutadas no mesênquima, sendo capazes de promoverem sua diferenciação em osteoblastos [STEIN et al., 1996].

Alguns trabalhos mostram que certas superfícies de titânio com diferentes microtopografias e rugosidades, afetam a produção de fatores de crescimento de atuação local e de citocinas pelos osteoblastos. Este comportamento sugere que os fatores de atuação local nos osteoblastos e até mesmo de fatores sistêmicos produzidos pelas células, podem ser controlados pela alteração da morfologia da superfície de implantes [KIESWETTER et al., 1996]. Fica sempre mais evidente que o recrutamento celular é determinado pela presença de fatores de quimiotaxia, que a adesão na interface tecido / biomaterial requer a presença de certas proteínas específicas e que a proliferação e diferenciação celular precisam que os fatores de crescimento locais e as citocinas estejam disponíveis, tudo isso, sendo induzido pelas características superficiais do implante.

Durante o período de cicatrização, as primeiras células que interagem com a superfície do material estão relativamente não diferenciadas, são na sua grande maioria células mesenquimais e que, poderão ser levadas a se diferenciarem em osteoblastos devido às influências da micromorfologia do substrato. Estas observações mostram que as respostas celulares à rugosidade, por exemplo, são dependentes do estágio de maturidade das células [BOYAN et al., 1996]. Uma das razões para a microtopografia afetar as células mesenquimais é a de que elas podem assumir as mais variadas morfologias em sua adesão e os diferentes arranjos de citoesqueleto irão influenciar nas informações transferidas às futuras gerações e nas aquisições de diferentes comportamentos fenotípicos [ANSELME, 2000].

II. 5.4 SISTEMAS COM LINHAS CELULARES X SISTEMAS COM CÉLULAS HUMANAS NORMAIS

É comum a utilização de linhas celulares já bem estabelecidas, obtidas em laboratório e apresentando numerosas características de osteoblastos, facilitando a repetitividade de testes *in vitro*. Assim, muitos biomateriais tiveram suas propriedades físicas e químicas correlacionadas ao comportamento biológico de linhas celulares de origem animal (MC3T3-E1, TMS-12, 2T9) [KURACHI et al., 1997; ONG et al., 1997; ANSELME et al., 2000a] ou de origem humana (MG63, Saos-2, ATCC HTB85) [LINCKS et al., 1998; DEGASNE et al., 1999].

Estas células não são osteoblastos saudáveis e, nem sempre, suas culturas são levadas até a mineralização ou até tempos de incubação suficientes para que as células alcancem maturidade, mostrando uma velocidade de desenvolvimento peculiar

ou característica para seus estágios de diferenciação em resposta ao tipo de superfície existente na interface células / substrato. Por exemplo, sabe-se que as células da linha MG63, originárias de osteosarcoma humano, não se mostram capazes de produzir uma matriz extracelular mineralizada [CASTELLANI et al., 1999].

As linhagens celulares pré-estabelecidas costumam ser mais resistentes ao ataque de microorganismos indesejáveis e, geralmente, possuem um ciclo de sobrevivência *in vitro* de cinética superior às culturas celulares primárias [FRESHNEY, 1996]. Testes preliminares com a utilização de linhas celulares MG63 foram realizados para a observação da viabilidade destas células, em culturas incubadas sobre todos os materiais testados neste trabalho e os resultados foram satisfatórios, permitindo a continuidade do estudo com a utilização de culturas primárias com origem na medula óssea humana.

As dificuldades intrínsecas à utilização de células humanas saudáveis, isto é, células de origem humana e normais, obtidas através de pacientes em boas condições de saúde para testes de sistemas de cultura com biomateriais, tornam o número de trabalhos que as utilizam pequeno. Apesar das complicações na obtenção e manutenção de culturas de osteoblastos humanos normais, espera-se que os resultados *in vitro*, obtidos nestes casos, sejam mais representativos na avaliação de biomateriais que são testados ou utilizados por seres humanos [DE SANTIS et al., 1996; FERRAZ et al., 1999; ANSELME et al., 2000b].

Testes *in vitro* com células humanas isoladas de ossos de maxilares de doadores adultos e saudáveis, cultivadas sobre superfícies de titânio com diferentes acabamentos superficiais e utilizando como controle positivo o desenvolvimento de culturas em paralelo sobre a superfície plástica padrão de placas para culturas celulares, mostrou que os tempos de incubação necessários para que as culturas sobre o titânio apresentassem bons resultados, com osteoblastos maduros, é bem superior aos períodos normalmente utilizados para linhas celulares de osteosarcoma humano [DE SANTIS et al., 1996].

Nota-se um comportamento típico de culturas de osteoblastos humanos e normais, diferente das culturas de osteoblastos de linhagens celulares; além dos períodos de incubação mais longos para as células normais, elas mostram um papel crucial da atividade da fosfatase alcalina (ALP) na inicialização da mineralização da matriz extracelular [MARTIN et al., 1993].

II. 5.5 OSTEOLASTOS COM ORIGEM NA MEDULA ÓSSEA HUMANA

Pré-tratamentos em materiais podem favorecer o comportamento biológico do tecido que cresce na sua interface, tal como sua prévia imersão em meio de cultura para sua posterior utilização como substrato em culturas de osteoblastos. Células com origem na medula óssea humana tiveram um aumento no crescimento e uma maior diferenciação quando foram cultivadas sobre materiais que tinham sofrido tratamento de pré-imersão em meio de cultura [FERRAZ et al., 1999]; este mesmo trabalho mostrou que células com origem na medula óssea humana, crescendo em presença de ácido ascórbico, β -glicerofosfato e dexametasona, apresentam características de osteoblastos, tal fato demonstrado pela presença de elevados valores de atividade da fosfatase alcalina (ALP "activity"). Estas condições experimentais favorecem o crescimento de osteoblastos em muitos sistemas de culturas, onde as células são incentivadas a se diferenciarem [MANIATOPOULOS et al., 1998; MARTIN et al., 1993; STEIN et al., 1996]. No caso dos osteoblastos com origem na medula óssea humana, uma matriz mineralizada pode ser gerada em períodos de incubação de até 4 semanas [COELHO et al. 2000a e 2000b; FERRAZ et al., 2001] .

Osteoblastos com origem na medula óssea humana obtida de doadores saudáveis, geralmente apresentam uma cultura com aumento de proliferação gradativa em relação ao tempo, este processo estando relacionado à formação da matriz extracelular. A atividade da fosfatase alcalina também aumenta gradativamente, onde os níveis desta enzima sofrem um significativo aumento entre a segunda e a terceira semana de incubação, sugerindo um estágio de maior grau de diferenciação celular. Após este período, os valores de atividade da fosfatase alcalina decrescem, geralmente ocorrendo a mineralização da matriz extracelular já a partir da terceira semana de incubação, uma situação específica dos sistemas de culturas de osteoblastos [FERRAZ et al., 1999; COELHO et al., 2000a e 2000b]. Quando a mineralização ocorre, glóbulos cristalinos podem ser observados em toda a matriz extracelular com a utilização da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

II. 5. 6 ADESÃO

Alguns trabalhos recentes tem examinado o mecanismo de adesão de osteoblastos em substratos que possuem as mais variadas propriedades superficiais [ANSELME, 2000]. A adesão celular é um processo fundamental que se envolve diretamente com

o crescimento, a proliferação, a migração, a diferenciação e todas as demais atividades relacionadas às células [GWYNN, 1994]. A adesão também irá influenciar a embriogênese, a manutenção da integridade do tecido, sua cicatrização, resposta imunológica, metástase e a integração com o biomaterial. Muitas proteínas estão envolvidas com a adesão celular - proteínas da matriz extracelular, proteínas do citoesqueleto e os chamados “ receptores de membrana” [ANSELME, 2000].

Alguns trabalhos mostram que a microtopografia de superfícies a base de titânio exerce influência sobre a adesão de osteoblastos humanos cultivados *in vitro*, onde uma cuidadosa análise das superfícies testadas revelou que as situações onde as áreas de contato entre as células aderidas e os substratos eram menores, as quantidades de células aderidas eram pequenas e também eram pequenas as proliferações [ANSELME et al., 2000b]. Superfícies de Ti-6Al-4V, jateadas com alumina e com aspecto morfológico bastante irregular (rugosidades médias $R_a = 2,19\mu\text{m}$ e $R_a = 3,40\mu\text{m}$), geraram pontos de contato com os osteoblastos somente nas extremidades das extensões de suas membranas celulares e com uma organização morfológica da camada celular de orientação randômica. Tal situação pode ter causado os resultados ruins de adesão e proliferação para estas superfícies jateadas, uma vez que, superfícies do mesmo material, porém lixadas ($R_a = 0,16 - 0,30\mu\text{m}$) apresentaram melhores resultados. Apesar das superfícies lixadas terem favorecido a adesão e a proliferação, com alguma organização da matriz extracelular, nada pode ser dito quanto às possibilidades de mineralização desta matriz, pois, o grau de diferenciação celular não foi avaliado neste caso.

II. 6 AS INFLUÊNCIAS CONJUNTAS DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MICROTOPOGRAFIA

Raros são os trabalhos que consideram os efeitos simultâneos da composição química da superfície e da microtopografia sobre o comportamento biológico celular. DEGASNE et al. (1999), mostraram que a presença de íons de titânio em meios de cultura padrão, liberados pelo substrato, aumentava significativamente com o aumento da rugosidade. Numa quantidade na faixa de $0,01 - 100 \text{ ng.ml}^{-1}$, estes íons não causavam danos à proliferação de osteoblastos, porém, algumas das atividades celulares eram inibidas. O aumento da liberação de íons para os meios de cultura em substratos mais rugosos, ocorre devido ao aumento da interface efetiva entre o titânio e o meio de cultura, provocado pela modificação da superfície e da sua maior extensão de área superficial efetiva. Certas faixas de rugosidade de superfícies de

titânio jateadas, mostraram favorecer a adesão e a proliferação para osteoblastos ($R_a = 0,94\mu\text{m}$), ao contrário de superfícies lixadas e atacadas com ácido nítrico ($R_a = 0,30\mu\text{m}$).

II. 7 A CARACTERIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

Uma cuidadosa caracterização físico-química das superfícies dos materiais utilizados para implantologia é necessária para a obtenção das informações da química superficial, energia e micromorfologia que irão inicializar a osteointegração. Assim, o projeto de um implante permanente de titânio, inclui a caracterização da superfície através de técnicas de análises físico-químicas padronizadas e muitos trabalhos tem incluído estas informações na avaliação do biomaterial.

Para os materiais que não liberam substâncias tóxicas ou indesejáveis, em quantidades que sejam suficientes para influenciar o comportamento celular, o corpo faz uma “ leitura” da estrutura superficial do implante e a ela irá responder.

As superfícies dos biomateriais sempre possuem maior reatividade e diferenças em relação ao “ bulk”, além de alguma contaminação que sempre irá existir nas condições em que os implantes são utilizados. O controle destas variáveis é que pode levar ao conhecimento que permita a repetitividade de resultados.

Muitos parâmetros superficiais podem ser medidos através da utilização de técnicas de caracterização e irão descrever a superfície do biomaterial, porém, infelizmente ainda não são conhecidos quais deles são os mais importantes nas respostas biológicas. A importância da rugosidade, da molhabilidade superficial, da composição química, cristalinidade e da heterogeneidade é comprovada mas ainda não totalmente compreendida, dado o grande número de parâmetros presentes nos processos de osteointegração.

Algumas investigações analisam a composição química superficial e a camada de óxido, incluindo as modificações causadas por tratamentos utilizados na prática clínica ou na preparação dos implantes (lixamentos, limpeza ultra-sônica, esterilização, eletropolimento, anodização). As técnicas de modificação de superfície tornam-se muito atrativas quando podem gerar camadas superficiais de óxidos sobre o titânio bem definidas e de propriedades reproduzíveis [TABORELLI et al., 1997].

Todas as investigações para caracterização superficial de implantes de titânio têm apresentado resultados onde a composição química gira em torno do dióxido de titânio (TiO_2), com variações na espessura da camada de óxido dependendo do tratamento utilizado e que geralmente variam entre 2 – 5nm [MARTIN, 1995], com uma taxa de crescimento na referida camada de alguns nanômetros por ano [ONG et al., 1995, 1997; TABORELLI et al., 1997; SÄUBERLICH et al., 1999]. Estes resultados confirmam a estabilidade da camada superficial de óxido de titânio, principalmente quando em contato com fluidos corpóreos.

O dióxido de titânio pode aparecer em três formas cristalinas distintas e a cristalinidade do TiO_2 parece aumentar com o aumento da espessura da camada oxidada sobre o titânio [WENNERBERG, 1996].

Outro grupo concentra estudos nas variações químicas da composição superficial ao longo do tempo, para implantes *in vivo* ou após longo tempo de exposição do substrato a soluções fisiológicas *in vitro* [FERRAZ et al., 1999].

A influência da microtopografia da superfície do titânio tem sido testada tanto em culturas celulares quanto *in vivo*, com substratos preparados pelos mais variados tratamentos superficiais, porém, conforme já mencionado, são mais comuns os trabalhos que não caracterizam a rugosidade superficial e, portanto, não quantificam a rugosidade gerada por estes tratamentos (jateamentos abrasivos, aspersão térmica, lixamentos, ataques químicos).

Trabalhos como os de MARTIN et al. (1995), DE SANTIS et al. (1996) e ANSELME et al. (2000b), fazem análises quantitativas da morfologia utilizando técnicas de microscopia eletrônica (“Confocal Laser Scanning Microscopy”) e perfilômetros. Em outro tipo de abordagem, modelos de microtopografia superficial foram definidos através de perfis geométricos, preparados por técnicas de microusinagem [WALBOOMERS et al., 1999; CHOU et al., 1998; BRUNETTE e CHEHROUDI, 1999]; eles apresentam uma micromorfologia bem caracterizada em escala micrométrica, adequada para estudos fundamentais de adesão e crescimento celular.

Existe sim, uma grande dificuldade de decisão na escolha da escala na caracterização do parâmetro rugosidade, uma vez que, os componentes biológicos que interagem com a superfície do implante abrangem uma larga faixa de dimensões, desde o tamanho da célula madura até o biofilme e as proteínas da membrana celular.

II.7.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode fornecer informações sobre a topografia da superfície da amostra, sua morfologia, composição (elementos presentes e suas quantidades relativas) e informações cristalográficas.

As imagens de superfícies obtidas por esta técnica possuem grande resolução, profundidade de campo visual e perspectiva tridimensional. O MEV utiliza um feixe incidente de elétrons de alta energia (5 – 30keV) sobre a amostra a ser analisada, análise esta, feita em escalas micrométricas. Elétrons secundários de baixa energia emergem da amostra como resultado das interações com o feixe incidente e a intensidade da emissão dos elétrons secundários é função da composição atômica de cada amostra e de sua microtopografia. As imagens obtidas pelo MEV são uma reconstrução espacial em uma tela de fósforo das variações de intensidade das emissões de elétrons secundários originários da amostra e que, devido à pequena penetração do feixe incidente, somente os elétrons secundários produzidos nas proximidades da superfície podem escapar do “bulk” e serem detectados.

Materiais não condutores podem ser examinados por MEV, desde que sejam recobertos com uma camada metálica fina e condutora, de espessura adequada de modo a não mascarar informações da geometria superficial, já que as informações da composição química da superfície original do material recoberto estarão perdidas.

Os resultados obtidos em MEV irão auxiliar na utilização de outros métodos de caracterização superficial e na interpretação de seus resultados, tais como as técnicas de caracterização química por espectroscopia de fotoelétrons por Raios-X (“X-Ray photoelectron spectroscopy”, XPS), também chamada de análise química por espectroscopia de elétrons (“electron spectroscopy for chemical analysis”, ESCA), determinação de ângulos de contato para avaliação da molhabilidade superficial e etc.

O feixe de elétrons incidente ou primário, também pode ter como resultado de suas interações com a amostra, a emissão de Raios-X. Estes últimos, podem ser utilizados para a identificação de elementos presentes na amostra, através de uma técnica conhecida como espectroscopia por dispersão de energia (“X-Ray Energy Dispersive Spectroscopy”, EDS). Neste caso, o feixe de elétrons primário que penetra a amostra pode ir até profundidades de aproximadamente 1 μ m e, neste caso, os Raios-X que são produzidos podem ter origem no interior da amostra (“bulk”) e por isso, o EDS não

é especificamente utilizado como técnica de análise superficial. O EDS pode determinar a composição química de partículas contaminantes, possibilita a identificação de elementos presentes em segundas fases e / ou partículas estranhas [MARTIN et al., 1995; RATNER, 1996a].

Elétrons retroespalhados também emergem da amostra nesta técnica de MEV e são dependentes do número atômico dos elementos presentes e, portanto, favorecem o contraste entre diferentes fases na imagem obtida. Os elementos de menor número atômico aparecem na imagem em MEV em campos mais escuros que os de maior número atômico, que aparecem em campos mais claros.

II.7.2 A ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS POR RAIOS-X

A espectroscopia de fotoelétrons por Raios-X (“X-Ray Photoelectron Spectroscopy“, XPS), ou também chamada análise química por espectroscopia de elétrons (“Electron Spectroscopy for Chemical Analysis“, ESCA) é um método baseado no efeito fotoelétrico descrito por Einstein em 1905. Raios-X bombardeiam a superfície da amostra e como resultado das interações entre os Raios-X incidentes e os elétrons dos átomos que constituem a mesma, elétrons energizados emergem de sua superfície, ditos fotoelétrons. Os elétrons que são fotoemitidos da superfície da amostra tem sua energia medida, provendo informações sobre a natureza dos elementos e os tipos de ligações químicas presentes, com uma conseqüente identificação de grupos funcionais e de tipos de moléculas.

Para a maioria dos metais, o XPS pode distinguir entre espécies oxidadas ou reduzidas; a técnica pode ser aplicada a todos os materiais sólidos, incluindo polímeros e vidros. Muitas são as informações que podem ser obtidas de até aproximadamente 100Å (10nm) de profundidade da superfície, dentre elas, a identificação de todos os elementos (exceto hidrogênio e hélio) presentes em concentrações atômicas maiores que 0,1%, determinação semi-quantitativa da composição química superficial aproximada ($\pm 10\%$) e informações do estado molecular (estado de oxidação, ligações atômicas, etc).

A técnica de XPS pode ser aplicada em superfícies planas e polidas ou em superfícies não planas, rugosas, microesferas ou pós com grande versatilidade nas análises químicas quantitativas, por vezes sem necessidade de qualquer ajuste no tratamento dos resultados experimentais [SLOMKOWSKI et al., 2000].

Entre as grandes vantagens do uso do XPS para estudo de biomateriais estão a rapidez da análise, o grande número de informações obtidas, a pequena probabilidade de causar danos à superfície da amostra e a não exigência de etapas prévias de preparação da mesma, permitindo análise de materiais condutores ou não condutores, análise de grupos funcionais em polímeros e outros materiais orgânicos, análise de filmes finos e a determinação de superfícies reativas.

Assim, muitos implantes ou partes deles, podem ser diretamente analisados no estado em que são utilizados nas inserções cirúrgicas, como fabricados ou como utilizados. A principal desvantagem é o elevado custo associado à análise.

II.7.3 PERFILOMETRIA

Uma das técnicas de caracterização mais antigas é a perfilometria ou profilometria. Historicamente, o método mais comum de parametrização superficial tem sido a medição mecânica das variações de altura da superfície ao longo de uma linha referencial. Tal linha, dependendo do tamanho escolhido, irá influenciar de modo significativo nos resultados obtidos, portanto, o método é dependente do operador e das escolhas dimensionais feitas, sendo uma limitação na comparação de medições.

A perfilometria é utilizada para a medição de parâmetros relacionados às características topográficas em superfícies de amostras e possibilita o estudo comparativo de textura superficial (rugosidade ou ondulações de superfície). Existem métodos de medição por contato mecânico e métodos sem contato mecânico, mais modernos, como o a laser, por exemplo.

O perfilômetro é geralmente o equipamento utilizado para a obtenção de valores quantitativos de rugosidade, mas também podem ser utilizados o MEV ou o microscópio de força atômica, esta última, uma técnica de caracterização limitada à superfícies praticamente polidas, sendo sensível à variações nanométricas sobre as mesmas [DESCOUTS et al, 1995]. Os parâmetros ou valores obtidos para comparar a rugosidade entre superfícies são definidos por algoritmos usados para transformar dados medidos pelo perfilômetro em valores numéricos e, apesar de existirem mais de 100 parâmetros, na prática geralmente são utilizados uns poucos. R_a ou rugosidade média é o parâmetro mais utilizado e medido.

Uma complicação no uso do parâmetro R_a é a diferenciação entre superfícies com morfologias distintas e que podem ter um mesmo valor medido de rugosidade média R_a , isto é, a diferenciação entre porosidades distintas. A Figura II.3 exemplifica quatro morfologias superficiais distintas possuindo valores de R_a muito próximos. Resultados clínicos correlacionados com propriedades do material são raros, em parte devido aos materiais que são utilizados não serem totalmente caracterizados devido à referida dificuldade [RATNER, 1996b].

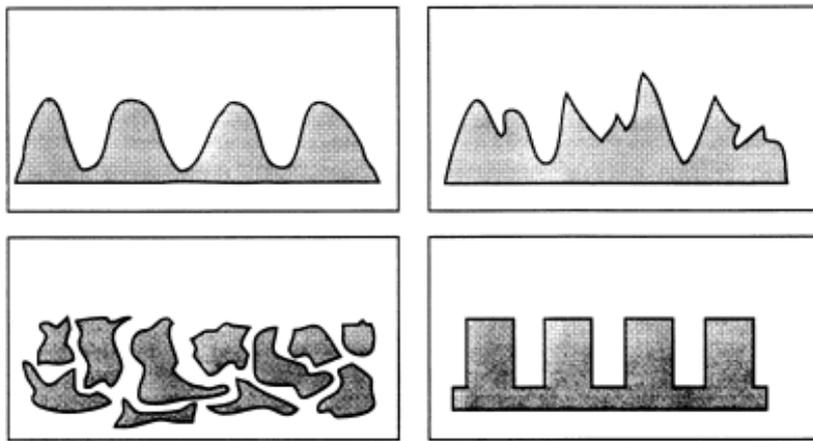


Figura II.3 – Quatro superfícies com o mesmo valor de rugosidade média (R_a).

II. 7.4 ÂNGULO DE CONTATO

A situação de equilíbrio entre tensão superficial líquido-vapor (γ_{lv}) de uma gota líquida e a tensão na interface de um sólido e esta gota (γ_{sl}), manifesta-se através de um ângulo de contato (θ) da gota com esta superfície e que pode ser utilizado para caracterizar a energia da superfície (γ_{sv}). A relação básica que descreve a situação do balanço de energia é dada por:

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cdot \cos\theta$$

A energia da superfície, a qual é diretamente relacionada com sua molhabilidade, é um parâmetro usualmente correlacionado com suas interações biológicas. Infelizmente, γ_{sv} não pode ser diretamente obtido desde que a equação possui dois termos desconhecidos, γ_{sl} e γ_{sv} . Assim, o valor de γ_{sv} é usualmente aproximado pelo método Zisman para obtenção da tensão crítica superficial [RATNER, 1996a].

Neste método, gotas de líquidos com diferentes tensões superficiais são colocadas sobre um sólido e seus ângulos medidos. Uma correlação linear entre as tensões superficiais dos líquidos (γ_{lv}) x ângulos de contatos medidos, permite a obtenção do valor da tensão crítica superficial (γ_C) na qual o ângulo de contato é zero.

Experimentalmente, existem uma série de maneiras de se medir o ângulo de contato entre um líquido e a superfície de um material sólido. O método da gota líquida sobre a superfície e o uso de um equipamento chamado goniômetro, o método de captação e aprisionamento da bolha de ar, o método da capilaridade, são exemplos pelos quais pode-se medir θ . A Figura II.4 esquematiza a situação da gota líquida sobre a superfície sólida e as tensões geradas entre as fases sólido – líquido – vapor na obtenção do ângulo de contato θ no equilíbrio.

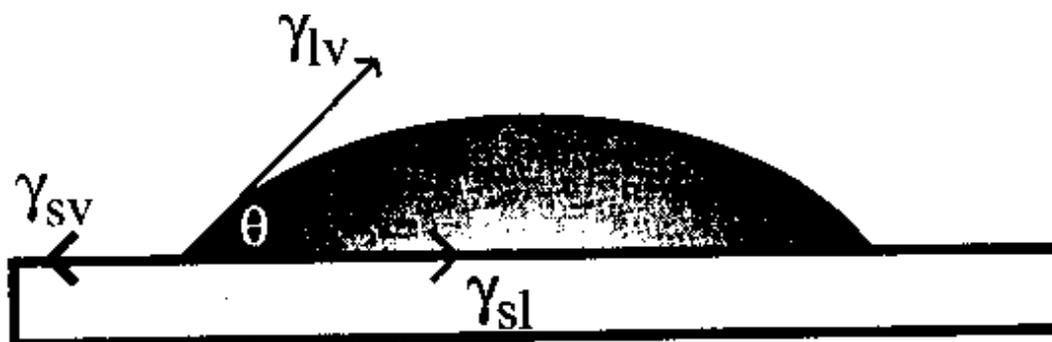


Figura II.4 – Uma forma de medir o ângulo de contato θ é através da gota líquida sobre a superfície sólida.

Algumas características são inerentes à técnica e devem ser levadas em consideração. As medidas são dependentes do operador, a rugosidade e a micromorfologia superficiais influenciam os resultados, os líquidos utilizados podem ser facilmente contaminados (tipicamente reduzindo o valor de γ_C), poucas são as geometrias de amostras que podem ser avaliadas e etc. Não obstante, as medidas de ângulo de contato providenciam informações comparativas entre diferentes superfícies e de como as mesmas interagem com o “ mundo externo” ou com outras fases.

Alguns trabalhos baseiam-se na hipótese de que a energia superficial obtida a partir das medições de ângulos de contato, gera uma faixa ou região ótima de tensões críticas superficiais, em torno de um valor $\gamma_C = 22.10^{-3} \text{N/m}$, na qual os biomateriais

possuem máxima biocompatibilidade [RATNER, 1996b]. A Figura II.5, extraída de RATNER (1996b), apresenta a curva de variação do grau de biocompatibilidade do material em função da tensão crítica superficial e a zona hipotética de ótima biocompatibilidade.

Testes *in vitro* tem procurado fazer investigações à procura dos melhores métodos para limpeza e esterilização de implantes de titânio, onde seriam obtidos os menores ângulos de contato entre as superfícies e a água, além da obtenção dos valores de tensão crítica superficial que levassem a uma melhor condição de ligação inicial entre as células e as superfícies tratadas [KAWAHARA, 1995]. Os resultados mostraram que, entre os procedimentos de limpeza e esterilização utilizando acetona, soluções à base de ácido fluorídrico e acetona, detergentes, autoclavagem em meio vapor, em ar seco e radiação ultra-violeta, somente as superfícies que tinham sido limpas com acetona ou com soluções onde ela estava presente, obtiveram os menores valores de ângulos de contato e maiores tensões críticas superficiais. Tais resultados indicaram que a acetona é um candidato potencial para a limpeza de superfícies de implantes, embora os testes *in vitro* não tenham oferecido resultados com diferenças significativas no processo inicial de adesão e nas observações morfológicas da células aderidas sobre todos os demais substratos submetidos aos referidos tratamentos de limpeza e esterilização.

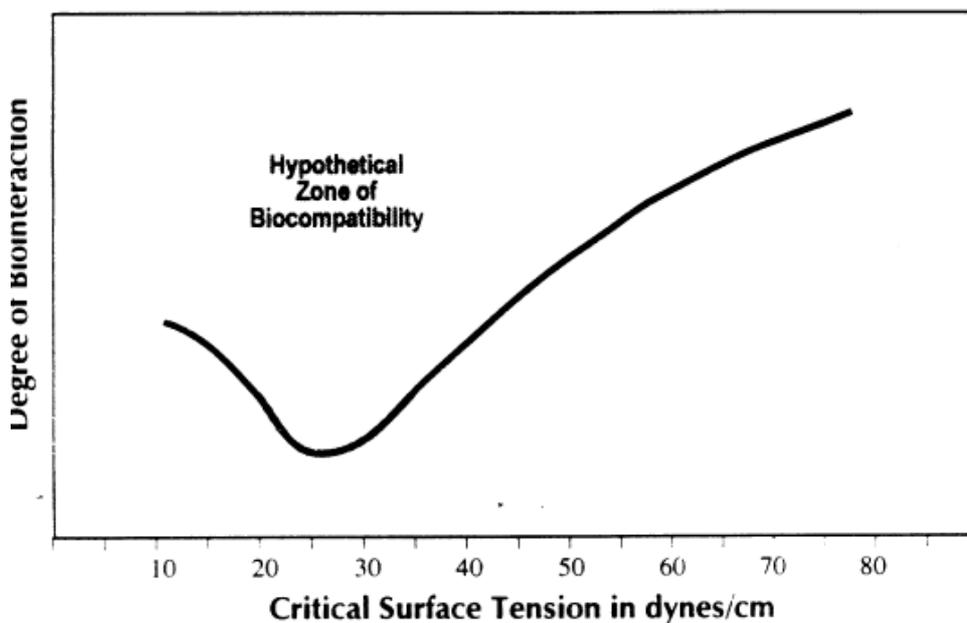


Figura II.5 – Uma hipótese de máxima biocompatibilidade para superfícies com tensões superficiais críticas em torno de $22 \cdot 10^{-3} \text{N/m}$ (22 dinas / cm) [RATNER, 1996b].

CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS

III. 1 PREPARAÇÃO DAS SUPERFÍCIES

Na preparação das superfícies foram utilizadas três chapas de titânio grau 2 (ASTM B265-58T, 99,2% Ti, limites máximos de 0,05% N, 0,10% C, 0,015% H, 0,25% O, 0,20% Fe) com 250 x 250 mm e 1,1mm de espessura. Duas chapas foram jateadas com óxido de alumínio (Al_2O_3 - alumina), sendo que uma das chapas foi jateada com partículas de granulometria média de $65\mu\text{m}$ e pressão de jateamento de 138 kPa (direta) e outra foi jateada com partículas de granulometria média de $250\mu\text{m}$ e pressão de jateamento de 414 kPa (de sucção). A Figura III.1 apresenta os aspectos micrográficos obtidos por microscopia eletrônica de varredura (elétrons secundários) do titânio grau 2 conforme recebido. As chapas encontravam-se em estado recozido com grãos equiaxiais.

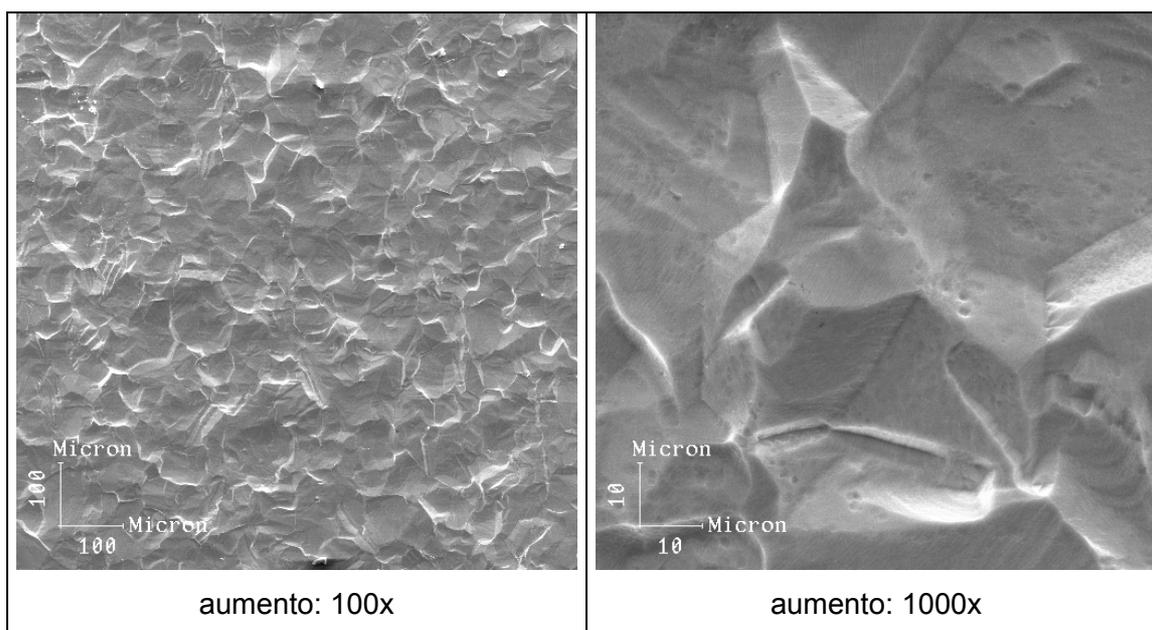


Figura III.1 – Aspectos micrográficos do titânio grau 2 utilizado, conforme recebido. O ataque químico de preparação metalográfica revelou grãos equiaxiais (HF 4% - 2000 segundos, HF 4% + H_2O_2 – 400 segundos).

Em seguida, todas as chapas foram cortadas em pequenas amostras de 8 x 8 mm de lado e aquelas que estavam com a superfície conforme recebida, isto é, não jateadas, foram lixadas com lixas metalográficas de SiC número 600. Todas as amostras foram submetidas a um processo de limpeza metalográfica em banho ultra-sônico com máxima intensidade do equipamento, conforme a seguinte seqüência:

- 1 – Em acetona pureza analítica (P.A.) durante 15 minutos;
- 2 – Em álcool etílico diluído em água destilada numa proporção 70%-30%, durante 15 minutos;
- 3 – Em água destilada durante 15 minutos.

A limpeza metalográfica em banho ultra-sônico tem como objetivo retirar gorduras, graxas, tintas, poeiras e partículas de impurezas oriundas do processo de preparação para obtenção das amostras de titânio.

Assim, os tratamentos mecânicos de lixamento e os jateamentos com duas granulometrias distintas de alumina, formaram três famílias de amostras, estabelecendo-se a seguinte nomenclatura:

L - amostras com superfícies lixadas com lixas metalográficas de carbetto de SiC número 600;

J65 - amostras com superfície jateada com partículas de Al_2O_3 de diâmetro médio $65\mu m$;

J250 - amostras com superfície jateada com partículas de Al_2O_3 de diâmetro médio $250\mu m$.

As três grandes famílias de amostras foram então subdivididas em grupos, sendo dois deles submetidos a tratamentos químicos com soluções ácidas e um subgrupo mantido como jateado (ou como lixado). A Tabela III.1 a seguir, apresenta as composições químicas e as condições dos ataques químicos realizados nas amostras.

TABELA III. 1 SOLUÇÕES E CONDIÇÕES EMPREGADAS NOS ATAQUES QUÍMICOS DAS AMOSTRAS DE TITÂNIO.

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO E CONDIÇÕES DE ATAQUE
S	100ml – 18% em peso de HCL e 100ml - 48% em peso de H_2SO_4 , temperatura ambiente por 30 minutos, etapa única.
F	1ª etapa: HF a 4% em volume por 60 segundos, em capela à temperatura ambiente; 2ª etapa: HF a 4% em volume e H_2O_2 a 8% em volume durante 15 segundos, em capela à temperatura ambiente.

Assim, os ataques químicos com as soluções ácidas S ou F, realizados sobre amostras das famílias L, J65 e J250 fizeram surgir nove condições de superfícies. A Tabela III. 2 apresenta a nomenclatura adotada para as diversas combinações de

tratamentos de superfície empregadas nesse trabalho. Foram confeccionadas 72 amostras para cada uma das condições, totalizando 648 amostras.

TABELA III. 2 RESUMO DAS COMBINAÇÕES DE TRATAMENTOS MECÂNICOS E QUÍMICOS REALIZADOS

NOMENCLATURA	TRATAMENTO MECÂNICO			TRATAMENTO QUÍMICO	
	Lixadas lixas 600	Jateadas Al ₂ O ₃ 65µm	Jateadas Al ₂ O ₃ 250µm	Solução S	Solução F
L0	X				
LS	X			X	
LF	X				X
J65-0		X			
J65-S		X		X	
J65-F		X			X
J250-0			X		
J250-S			X	X	
J250-F			X		X

A seguir, todas as amostras foram submetidas a uma nova limpeza em banho ultrassônico (10 minutos em álcool etílico 99,8% em volume, 5-7 minutos em água destilada e deionizada, secas em estufa à 37°C por 24 horas) e foram esterilizadas em autoclave à 121°C e 124kPa por um período de 45 minutos.

Amostras limpas e esterilizadas foram utilizadas nas etapas de caracterização das superfícies e nos testes em culturas celulares.

III. 2 CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES

Dentre as técnicas comumente empregadas na caracterização de materiais, foram escolhidas a espectroscopia de fotoelétrons por Raios-X (“X-Ray photoelectron spectroscopy”, XPS) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV), num equipamento dotado de detectores de elétrons secundários (“secondary electrons”, SE) e de elétrons retroespalhados (“backscattered X-Ray electrons”, BSE), além um sistema analítico de espectroscopia por dispersão de energia (“X-Ray energy dispersive spectroscopy”, EDS). Um perfilômetro foi o equipamento utilizado para a obtenção do

parâmetro comparativo de rugosidade média das superfícies estudadas; para as medidas dos ângulos de contato entre diferentes líquidos foi usado o goniômetro.

III. 2.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

O XPS VG Scientific Escalab equipado com uma fonte de Raios-X de Mg K_{α} (300W a15kV) e programa para análise de dados coletados VG 5250 foi empregado para a determinação da composição química da camada mais externa de todas as superfícies desenvolvidas neste trabalho. A composição química das superfícies (% atômica) das várias amostras foi determinada pela consideração da integração das áreas sob os picos de C 1s, Ti 2p, O 1s, N 1s e Al 2p.

A identificação química de partículas presentes nos substratos produzidos pela combinação de tratamento mecânicos e/ou químicos foi realizada num um sistema analítico de espectroscopia por dispersão de energia (EDS) LINK acoplado ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) ZEISS DSM 940A, operando a 20kV.

III. 2.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

As morfologias das superfícies das amostras de titânio obtidas por diferentes tratamentos mecânicos associados ou não aos tratamentos com soluções ácidas, foram observadas através de imagens de elétrons secundários (SE) obtidas no microscópio eletrônico de varredura anteriormente citado.

Imagens produzidas a partir de elétrons retroespalhados (BSE) também foram empregadas para facilitar a identificação de elementos contaminantes na superfície das amostras.

III. 2.3 DETERMINAÇÃO DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL

A rugosidade das superfícies dos substratos foi quantificada num perfilômetro de superfície SLOAN, modelo Dektak II, com agulha de diamante com uma sensibilidade de medida vertical de 0,5 nm. As rugosidades foram medidas ao longo de uma linha horizontal de 1mm e com uma programação de alta sensibilidade. Para cada condição de superfície, utilizaram-se três amostras e, no mínimo, 10 medidas para obtenção do valor R_a (rugosidade média) foram efetuadas em cada amostra. Um valor R_a médio e seu desvio padrão para os nove tipos de substratos foi determinado e uma análise

estatística de variância com 95% de confiabilidade para o teste das igualdades das médias numa distribuição t de Student foi feita.

III.2.4 MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO

Os ângulos de contato entre água destilada, glicerol e as superfícies produzidas foram medidos num goniômetro KERNCO CP600 – 1 com alcance de 0 – 180°, precisão de $\pm 1,5^\circ$, seringa com capacidade para 50 – 75 gotas (5 μ l), a 240 V CA / 60 Hz, com capacidade de ampliação na projeção da imagem da gota de 6 vezes ou 12 vezes. Para cada condição de superfície, foram utilizadas três amostras e, no mínimo, 10 medidas por amostra foram efetuadas para obtenção do valor θ (ângulo de contato entre o fluido e a superfície). Um valor θ médio e seu desvio padrão para cada um dos nove tipos de substratos foi determinado. A tensão superficial crítica γ_C , para cada condição, foi determinado por meio de uma relação linear entre os cossenos dos valores medidos de ângulos de contato e as respectivas tensões superficiais dos líquidos em equilíbrio com seus vapores ($\gamma_{L \text{ v}}$). Foram empregados para água destilada / vapor d'água $\gamma = 72.10^{-3}$ N/m e para o glicerol / vapor de glicerol $\gamma = 63.10^{-3}$ N/m [BAUMEISTER, 1978]. A tensão superficial crítica é determinada por regressão linear para $\cos\theta = 1$ ou $\theta = 0^\circ$, condição de molhabilidade completa onde se espera a formação de filmes finos e total adesão entre fluido e sólido [RATNER, 1996a].

III. 3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO*

III. 3.1 CULTURAS CELULARES

As culturas de osteoblastos foram efetuadas a partir da medula óssea humana, obtida de pacientes adultos e saudáveis submetidos a cirurgia corretiva ortopédica. A medula óssea foi cultivada em α - MEM (Meio Essencial Mínimo; α -MEM - 10,08g/l, água destilada e deionizada e NaHCO₃ - 2,2g/l), contendo nutrientes para alimentação das células e enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 2,5 μ g/ml de fungizona e 50 μ g/ml de gentamicina. Os dois últimos componentes são, respectivamente, um antifúngico e um antibiótico, e tem a função de evitar possíveis contaminações das culturas celulares por fungos e bactérias. Todo este procedimento encontra-se protocolado no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina dentária da Universidade do Porto – Portugal.

Esta cultura primária foi incubada a 37°C numa atmosfera úmida nas proporções de 95% de ar e 5% de CO₂ em placas de Petri padrão para culturas celulares e o meio foi trocado duas vezes por semana. Após um período de 22 dias, a cultura primária atingiu uma situação próxima da confluência, tendo sido durante todo este tempo monitorada diariamente pela utilização de um microscópio de fase invertido, quando então, as células foram libertadas enzimaticamente por uma solução contendo 0,04% de tripsina e 0,025% de colagenase e contadas por um equipamento do tipo hemocitômetro modelo Celltac – NIHON KOHDEN.

Muitos testes para condições de culturas de células aderentes realizados anteriormente no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto – Portugal determinaram uma densidade de células mínima da ordem de 10⁴ células/cm² para a utilização de culturas semeadas em placas de 24 poços padrão para culturas celulares ou 2.10⁴ células/ml.

As células da primeira subcultura foram então semeadas sobre as amostras de titânio colocadas em placas de 24 poços, próprias para culturas celulares, numa densidade de 4.10⁴ células/ml de suspensão. As subculturas foram mantidas por períodos variáveis, num intervalo de 3 até 28 dias, em condições experimentais idênticas às utilizadas na cultura primária, exceto pela presença de aditivos ao meio de cultura específicos para o crescimento e o desenvolvimento de osteoblastos, isto é, dexametasona (10nM), β - glicerofosfato (10nM) e ácido ascórbico (50μg/ml) [MANIATOPOULOS et al., 1998; MARTIN et al., 1993; STEIN et al., 1996; COELHO et al., 2000a e 2000b].

As experiências com as culturas semeadas sobre as placas de titânio tiveram como controle positivo o desenvolvimento de culturas sobre a superfície plástica das placas de 24 poços. As culturas foram analisadas para viabilidade celular / proliferação e atividade da fosfatase alcalina (ALP “activity”) aos 3, 7, 14, 21 e 28 dias.

III. 3.2 MORFOLOGIA CELULAR

A morfologia celular nas culturas de controle foi observada, diariamente, por microscopia de contraste, num microscópio de fase invertido, para o monitoramento do processo. Nas culturas sobre os substratos de interesse, as células foram observadas e fotografadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), nos períodos iniciais das culturas e também ao longo dos períodos de incubação. Os tempos iniciais

observados foram de 4, 7, 24 e 72 horas, quando então as células viáveis já estavam aderidas sobre os materiais nas condições experimentais especificadas. Os tempos máximos observados correspondem aos 21 e 28 dias de incubação.

A morfologia celular sobre os substratos durante os períodos de incubação definidos e a possível presença de depósitos minerais que mostrariam a capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada, foram avaliados pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando-se um equipamento JEOL JSM 6301F, operando a 15 kV e equipado com um sistema de espectroscopia por dispersão de energia para a microanálise (“X - Ray energy dispersive spectroscopy”, EDS, Voyager XRMA System Noran Instruments).

As culturas sobre os materiais foram fixadas e posteriormente submetidas a uma secagem em atmosfera de CO₂ até o ponto crítico. Um revestimento fino de ouro cobriu as células fixadas sobre as superfícies de titânio. A metodologia dos procedimentos de fixação das células e desidratação está descrita no apêndice A.

III. 3.3 MÉTODOS BIOQUÍMICOS

Os métodos bioquímicos utilizados tiveram como finalidade a avaliação do desenvolvimento das culturas celulares de controle e sobre os materiais testados, através de testes característicos que medem a viabilidade / proliferação celular e marcadores específicos do comportamento fenotípico dos osteoblastos. A viabilidade / proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de MTT e a diferenciação celular pelo ensaio de atividade da fosfatase alcalina (“alkaline phosphatase activity” – ALP “activity”).

A – VIABILIDADE / PROLIFERAÇÃO CELULAR

A viabilidade / proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de MTT [BERRIDGE e TAN, 1993], um método semi-quantitativo no qual a quantidade de proteína intracelular das células viáveis fica evidenciada na operação de redução do sal de MTT (“reduction of 3 – (4,5 – dimethylthiazol – 2 yl) – 2,5 – diphenyltetrazolium bromide”) e determinação espectrofotométrica do produto formado, os cristais de Formazan.

O MTT é incorporado pelas células metabolicamente ativas, produzindo cristais de cor púrpura, cristais de Formazan, que se acumulam em seu interior ao nível das

mitocôndrias. Assim, no fim de cada período estudado, foram adicionados 50µl de MTT a cada poço (ou 0,5mg/ml), permanecendo assim por 4 horas em estufa a 37°C, atmosfera de ar úmido com 95% ar – 5% CO₂ para que as células produzissem os cristais de Formazan. No fim deste tempo, os meios foram decantados; foram adicionados 200µl de Dimetilsulfóxido (DMSO) a cada poço e foram agitados manualmente à temperatura ambiente durante 1 minuto, cuidadosamente, para que os cristais de Formazan fossem dissolvidos em solução. O DMSO provoca a fragmentação das membranas celulares e libera os cristais formados.

Foi utilizado um espectrofotômetro ELISA (Denley Wellscan) a 600 nm para a leitura dos poços que, quanto mais intensa a coloração púrpura apresentassem em sua solução, maior a quantidade de células viáveis estavam aderidas. Ao fim de cada período de incubação das culturas, foram realizados testes de MTT sobre as células aderidas aos substratos de titânio e sobre as superfícies de controle. Os testes de MTT foram feitos em duplicata para cada condição de superfície e em cada um dos períodos de incubação das culturas, isto é, nos dias 3, 7, 14, 21 e 28. Os resultados de MTT serão apresentados pela média dos dados obtidos para duas amostras (média ± desvio padrão).

B - ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA

Ao término dos períodos de incubação estudados, os poços contendo as culturas sobre os materiais e os respectivos controles, foram lavados duas vezes com solução de PBS com pH 7,4 (“Phosphate-Buffered Saline Solution”) e guardados a –20°C até o final de todos os experimentos, isto é, até o período de 28 dias de cultura. A determinação da atividade da fosfatase alcalina foi avaliada segundo um método já testado e protocolado, para os mesmos sistemas de culturas de células, pelo Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, Portugal, sendo feita através da obtenção de uma suspensão oriunda das células aderidas com a adição de 100µl de água destilada contendo 0,1% de Triton-X a cada poço. Esta solução provoca a liberação da proteína contida no interior das células viáveis até o período em que a cultura foi mantida. O processo segue-se com a adição de 80µl de uma solução à base de p-nitrofenilfosfato a cada poço, numa concentração de 25mmol/l de p-nitrofenilfosfato em meio tampão alcalino de pH 10,3 e permanência das placas de 24 poços contendo os materiais e as superfícies de

controle em estufa à 37°C por um período de reação de 30 minutos que é interrompida pela utilização de 20µl de NaOH 5 M a cada poço.

O p-nitrofenilfosfato é hidrolisado pela fosfatase alcalina, enzima produzida pelos osteoblastos, e o produto formado de p-nitrofenol é medido colorimetricamente, em cada poço, por absorvância em espectrofotômetro a $\lambda = 405\text{nm}$ num equipamento ELISA (Denley Wellscan). As absorvâncias dos testes são comparadas pelo ELISA com valores obtidos para uma série de padrões de p-nitrofenol. Os resultados foram expressos em nanomoles/minuto/cm² de p-nitrofenol produzido (nmol/min/cm²). Os resultados que serão apresentados foram obtidos pela média dos dados obtidos para testes em duplicata (média \pm desvio padrão).

CAPÍTULO IV – RESULTADOS

IV. 1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ENERGÉTICA DAS SUPERFÍCIES

IV. 1.1 MICROTOPOGRAFIA

A Figura IV.1 (a) apresenta os aspectos micrográficos gerais obtidos no MEV com elétrons secundários (SE), das 9 condições de superfícies testadas. Os aspectos mais detalhados dos acabamentos superficiais de cada condição, podem ser observados na Figura IV.1 (b). Os aspectos micrográficos gerais obtidos no MEV com elétrons retroespalhados (BSE), para as superfícies que sofreram jateamento abrasivo com partículas de alumina, isto é, J65, e J250, são apresentados nas Figuras IV.2 (a). Os aspectos mais detalhados, também obtidos à partir de elétrons retroespalhados (BSE) no MEV, para estas mesmas superfícies, apresentam-se na Figura IV.2 (b).

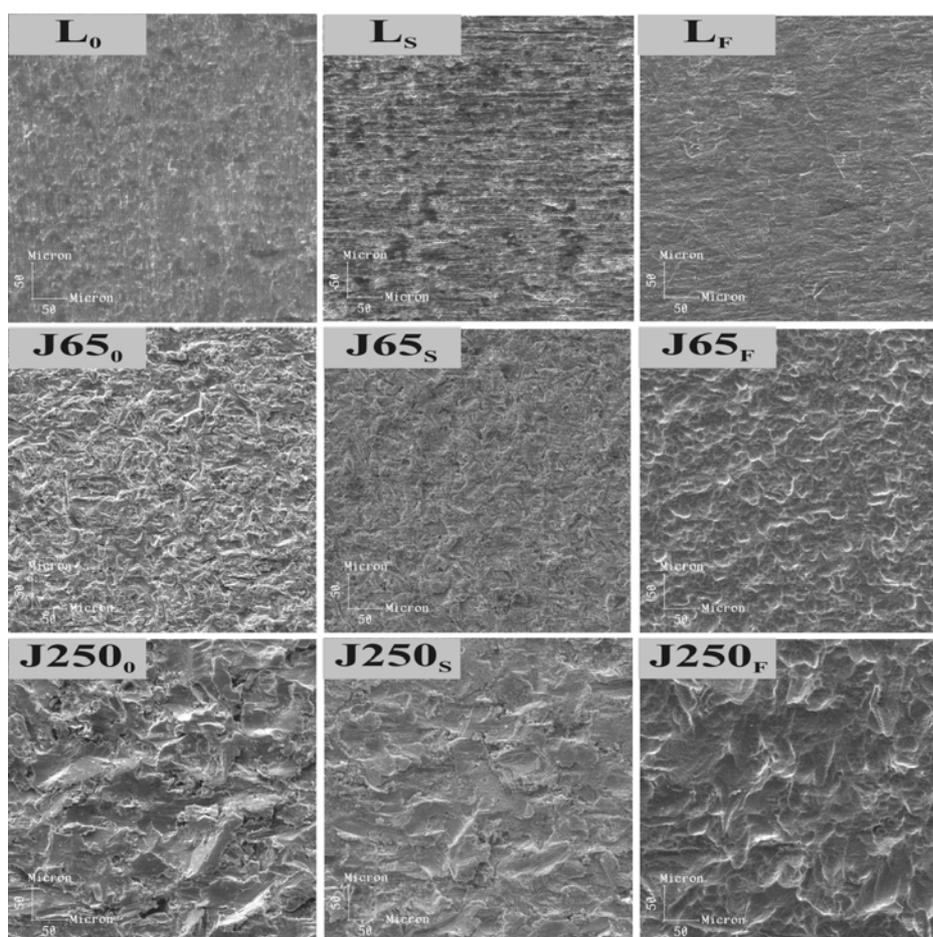


Figura IV.1 (a) - Aspectos micrográficos das 9 superfícies testadas (200X, SE).

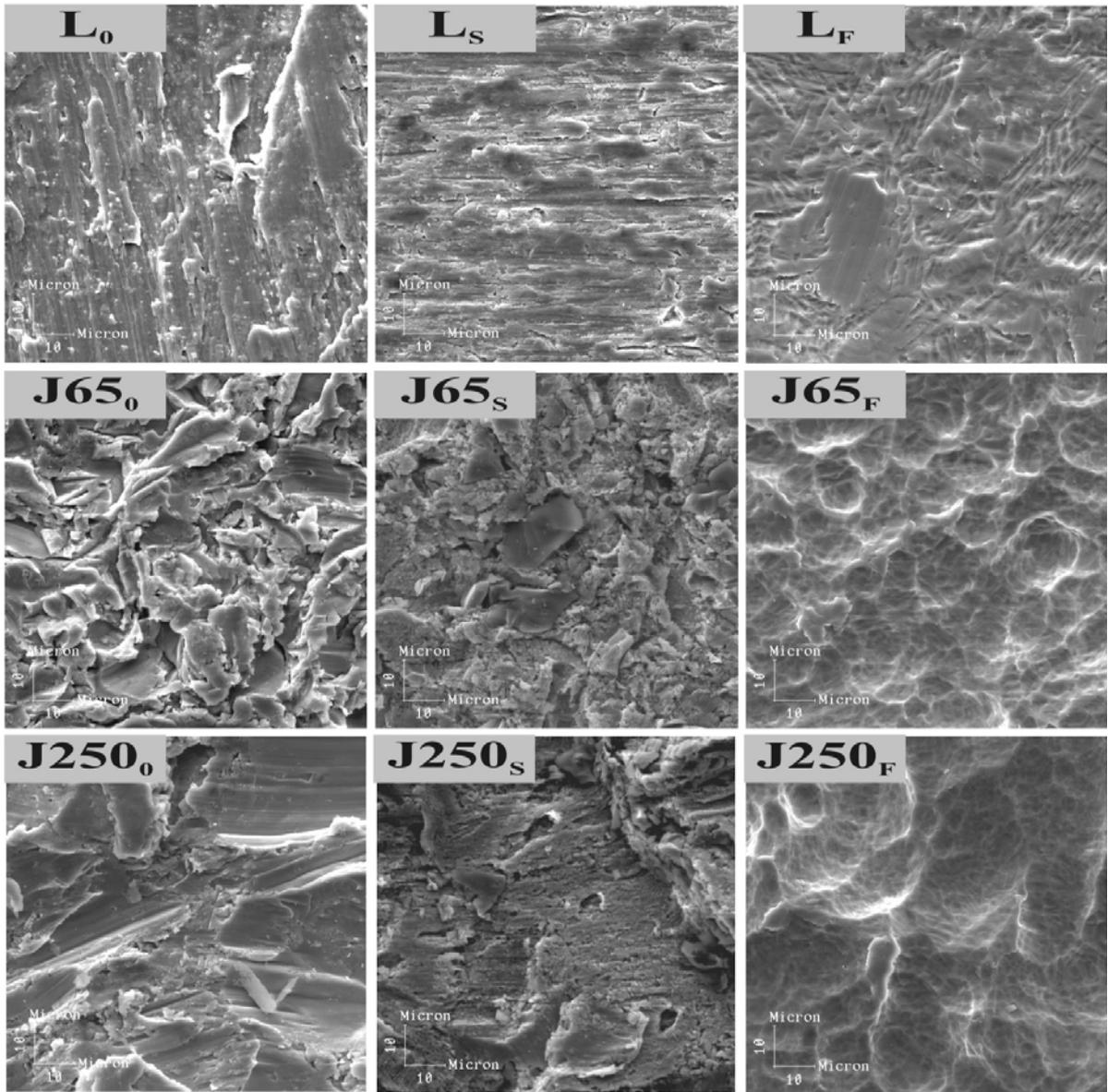


Figura IV.1 (b) - Aspectos micrográficos das 9 superfícies testadas (1000X, SE).

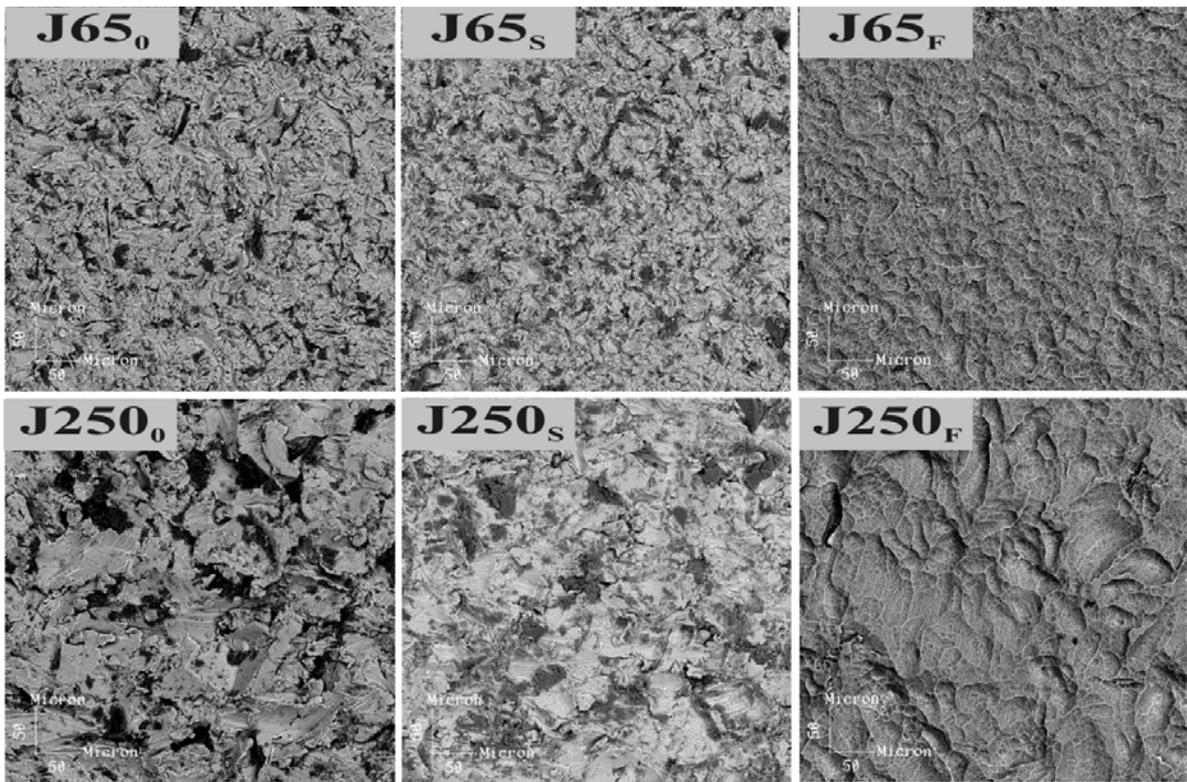


Figura IV.2 (a) - Aspectos micrográficos das superfícies jateadas (200X, BSE). As imagens mostram superfícies contendo partículas de alumínio (regiões escuras) sobre a superfície do titânio (matriz clara).

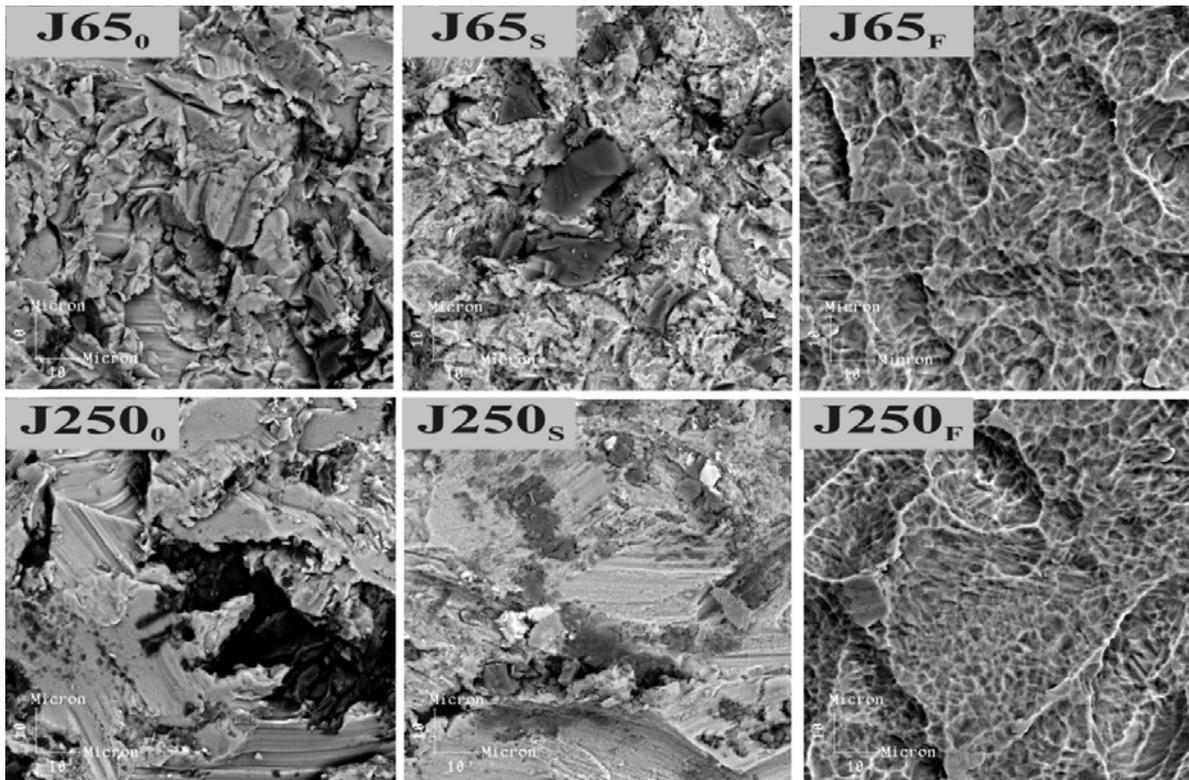


Figura IV.2 (b) - Aspectos micrográficos das superfícies jateadas (1000X, BSE). As imagens mostram superfícies contendo partículas de alumínio (regiões escuras) sobre a superfície do titânio (matriz clara).

IV. 1.2 RUGOSIDADE

A Tabela IV.1 apresenta os valores médios e desvios padrões do parâmetro R_a (rugosidade média) para todas as superfícies testadas.

A Tabela IV.2 apresenta os resultados dos testes de igualdade de médias pela distribuição de Student (t), o nível mínimo considerado significativo de 2,2% e variância total de 26% para uma distribuição bicaudal. Os valores percentuais representam a estatística da probabilidade dos valores de R_a , para os respectivos grupos de amostras, pertencerem a uma mesma família, isto é, a probabilidade de possuírem valores estatisticamente iguais de R_a .

Tabela IV.1 – PARÂMETRO R_a (média e desvio padrão em μm) PARA AS AMOSTRAS TESTADAS

Amostra	Após tratamento mecânico (0)	Após tratamento mecânico e ataque com solução S	Após tratamento mecânico e ataque com solução F
L_i	$0,47 \pm 0,17$	$0,31 \pm 0,09$	$0,38 \pm 0,15$
J65 _i	$1,00 \pm 0,18$	$0,88 \pm 0,18$	$0,80 \pm 0,14$
J250 _i	$3,59 \pm 0,73$	$3,31 \pm 0,77$	$3,09 \pm 0,70$

Tabela IV.2 – TESTE DE IGUALDADE DAS MÉDIAS POR STUDENT. OS VALORES SOMBREADOS SÃO EXPERIMENTOS COM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE IGUAIS (DE MESMA MÉDIA).

Total var. 26%	Caudas 2	t (teste de igualdade de médias)							
		LS	LF	J65-0	J65-S	J65-F	J250-0	J250-S	J250-F
	L0	0,00%	3,16%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	LS		4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	LF			0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	J65-0				0,89%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	J65-S					7,40%	0,00%	0,00%	0,00%
	J65-F						0,00%	0,00%	0,00%
	J250-0							13,40%	0,61%
	J250-S								21,88%

IV.1.3 ÂNGULOS DE CONTATO E TENSÕES SUPERFICIAIS CRÍTICAS

Os sólidos são frequentemente caracterizados por uma tensão crítica superficial, γ_c , a qual é obtida pela medida dos ângulos de contato θ com uma série de líquidos homólogos [ADANSON, 1990].

A Tabela IV.3 apresenta os resultados dos ângulos de contato obtidos entre água destilada e glicerol, para todas as superfícies testadas e as respectivas tensões superficiais críticas estimadas.

Tabela IV.3 – ÂNGULOS DE CONTATO E TENSÕES SUPERFICIAIS CRÍTICAS
PARA AS SUPERFÍCIES TESTADAS.

Amostra	ÁGUA DESTILADA θ°	GLICEROL θ°	TENSÃO CRÍTICA γ_c (10^{-3} N/m)
L0	85,4 ± 1,45	74,3 ± 1,47	6,00
LS	87,2 ± 1,50	76,2 ± 1,26	6,20
LF	86,5 ± 1,44	75,6 ± 1,52	3,60
J65-0	81,2 ± 1,35	70,6 ± 1,49	6,80
J65-S	82,5 ± 1,58	71,4 ± 1,44	10,40
J65-F	84,8 ± 1,47	73,3 ± 1,39	6,20
J250-0	76,4 ± 1,28	66,1 ± 1,15	9,80
J250-S	77,3 ± 1,35	66,6 ± 1,56	11,20
J250-F	79,0 ± 1,29	67,5 ± 1,33	11,20

IV. 2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS SUPERFÍCIES

IV.2.1 EDS

Foram identificadas por EDS partículas ricas em alumínio nas superfícies das amostras jateadas simplesmente e nas amostras jateadas seguidas por ataque ácido com solução do tipo S. A análise por EDS não acusou a presença de alumínio nas demais superfícies. A Figura IV.3 apresenta um espectro obtido por EDS característico, mostrando a presença de alumínio nas amostras unicamente jateadas e jateadas seguidas de ataque com solução S.

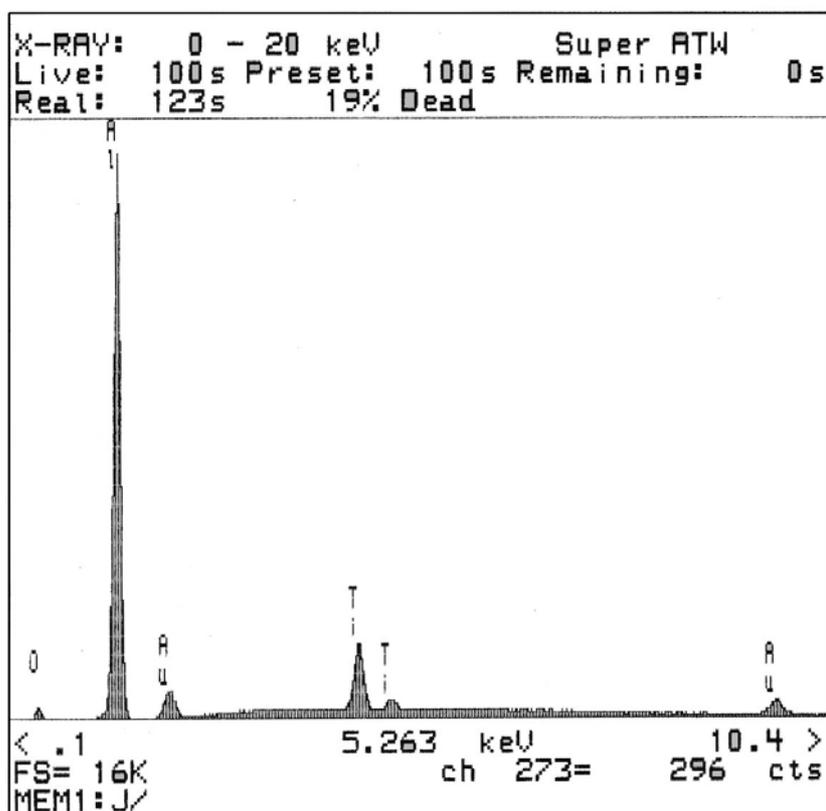


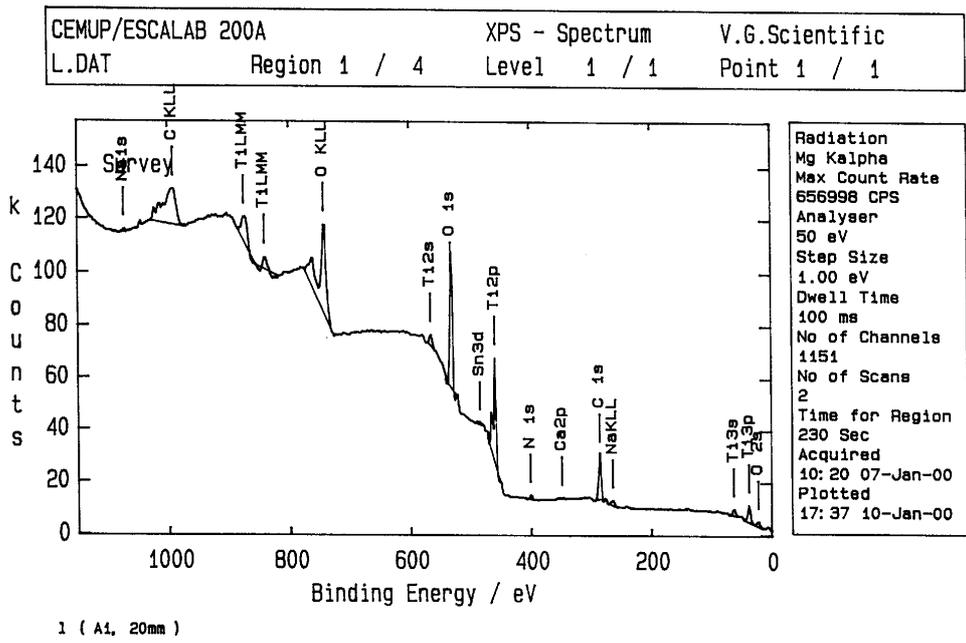
Figura IV.3 – Espectro de EDS típico mostrando a presença de partículas de alumínio, em picos significativamente elevados (amostra J250-0).

IV. 2.2 XPS

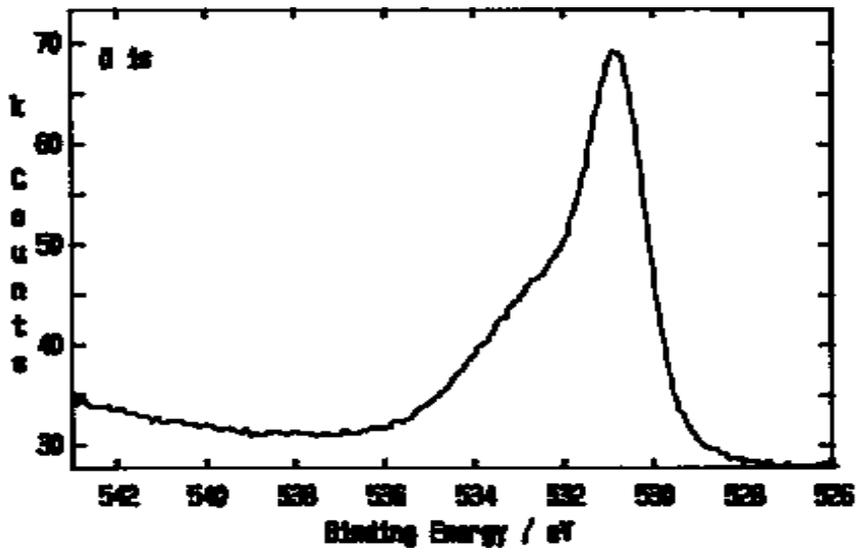
As Figuras IV.4 a IV.6 apresentam os espectros de XPS obtidos para todas as superfícies testadas, numa visão geral e no detalhe em torno dos picos de oxigênio. Os espectros de XPS para todas as 9 condições de superfície, apresentaram um pico de oxigênio em torno de 530,4 eV, valor associado ao TiO_2 .

Os espectros para as superfícies das amostras jateadas do tipo J65-0, J65-S, J250-0 e J250-S apresentaram um pico de oxigênio em torno de 532,2 eV associado ao óxido de alumínio na forma de Al_2O_3 (Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy, 1979).

Os resultados das composições químicas das superfícies das 9 condições, obtidos através da quantificação dos respectivos espectros de XPS, são apresentados na Tabela IV.4, valores expressos em % atômica.

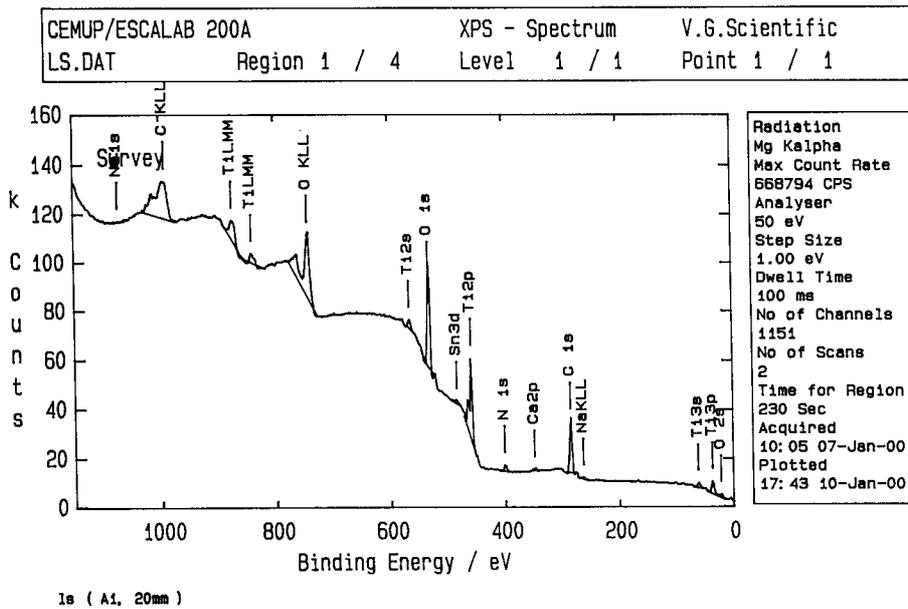


(a) L0 – aspecto geral

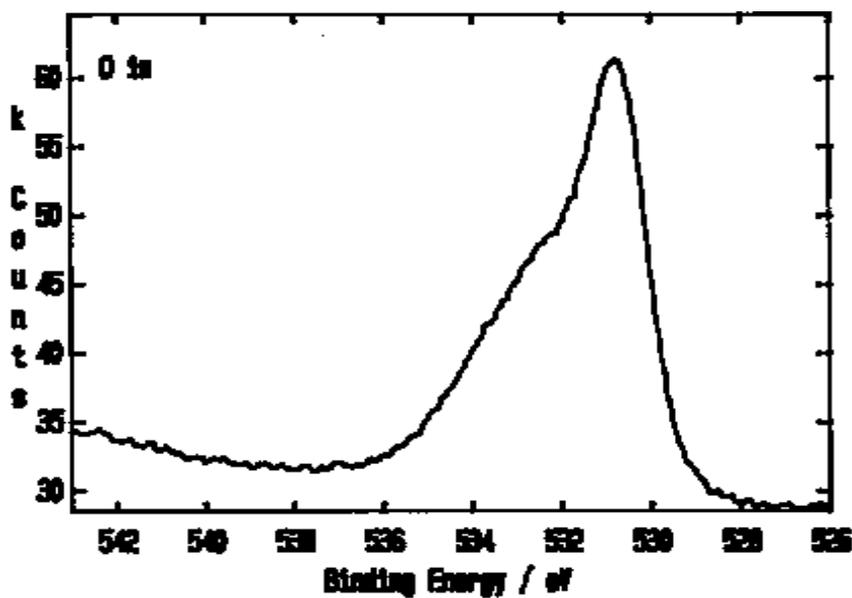


(b) L0 - detalhe

Figura IV.4 – Espectros de XPS para as amostras com superfícies lixadas L_i e os picos associados ao oxigênio.

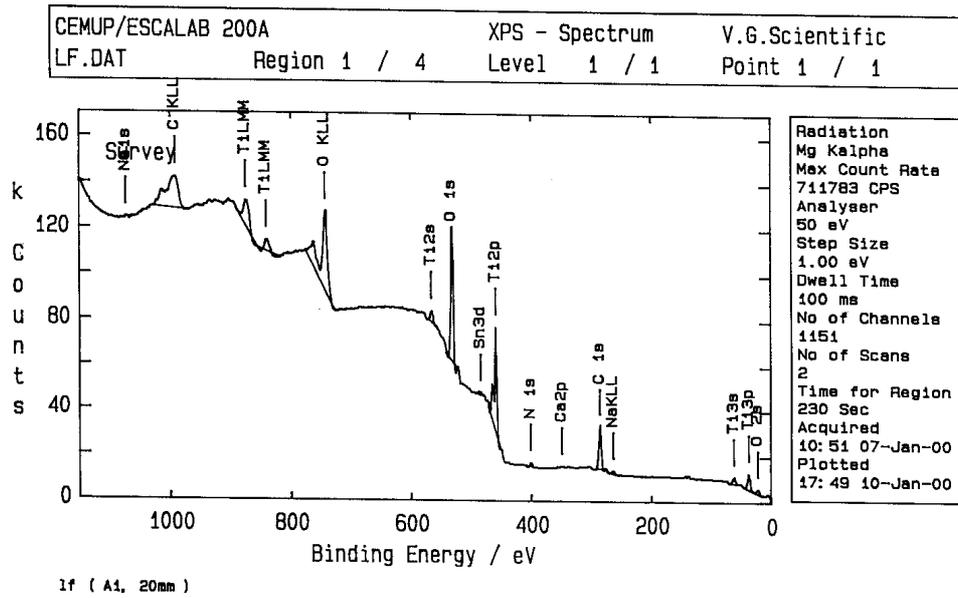


(c) LS – aspecto geral

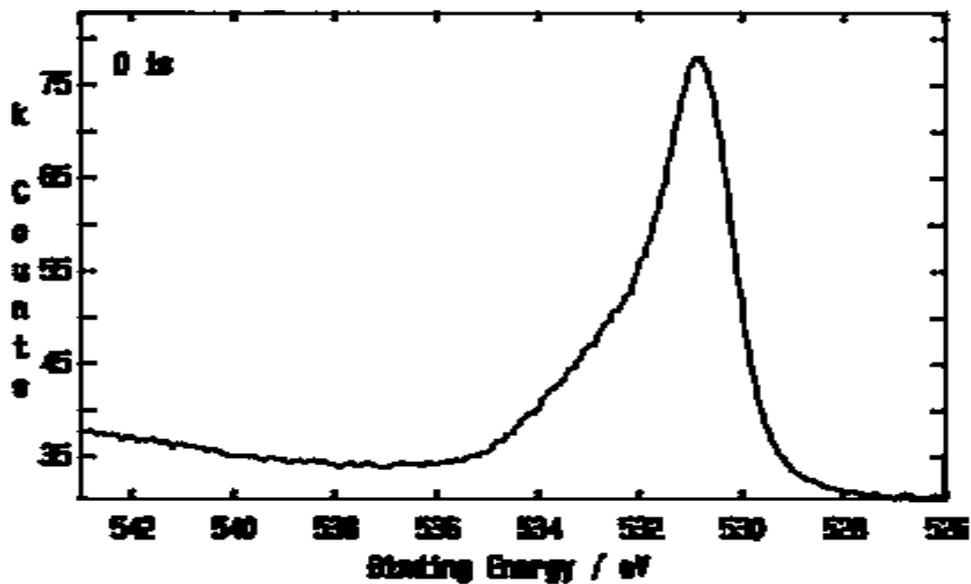


(d) LS - detalhe

Figura IV.4 – Espectros de XPS para as amostras com superfícies lixadas L_i e os picos associados ao oxigênio (continuação).

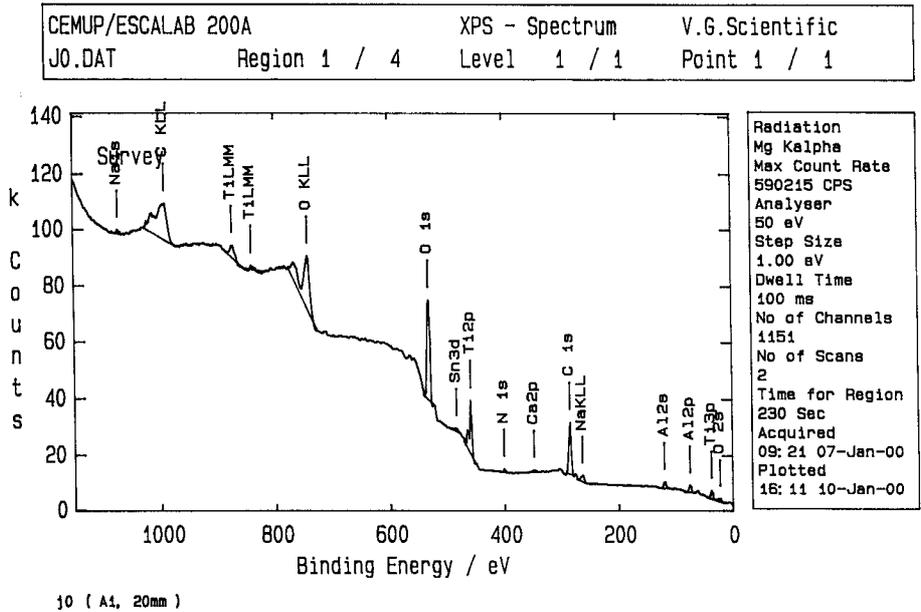


(e) LF – aspecto geral

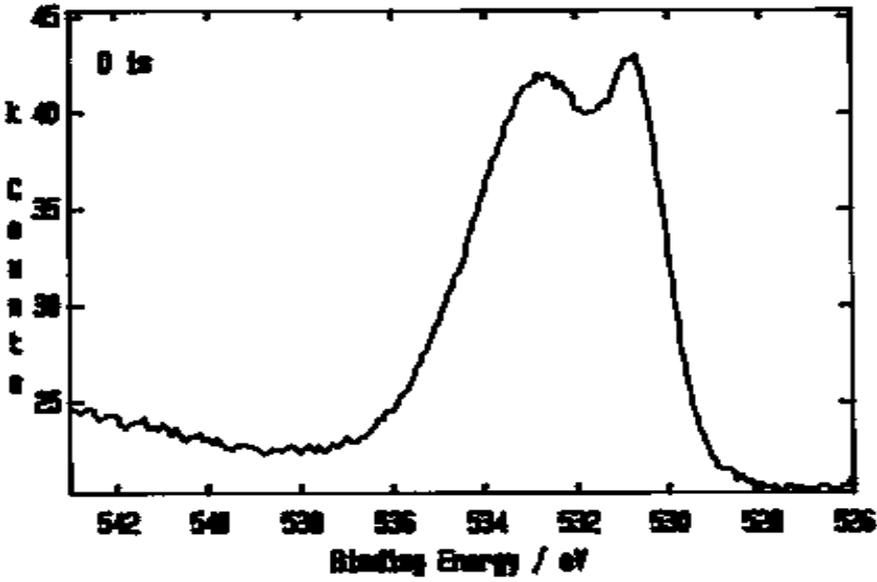


(f) LF - detalhe

Figura IV.4 – Espectros de XPS para as amostras com superfícies lixadas L_i e os picos associados ao oxigênio (continuação).

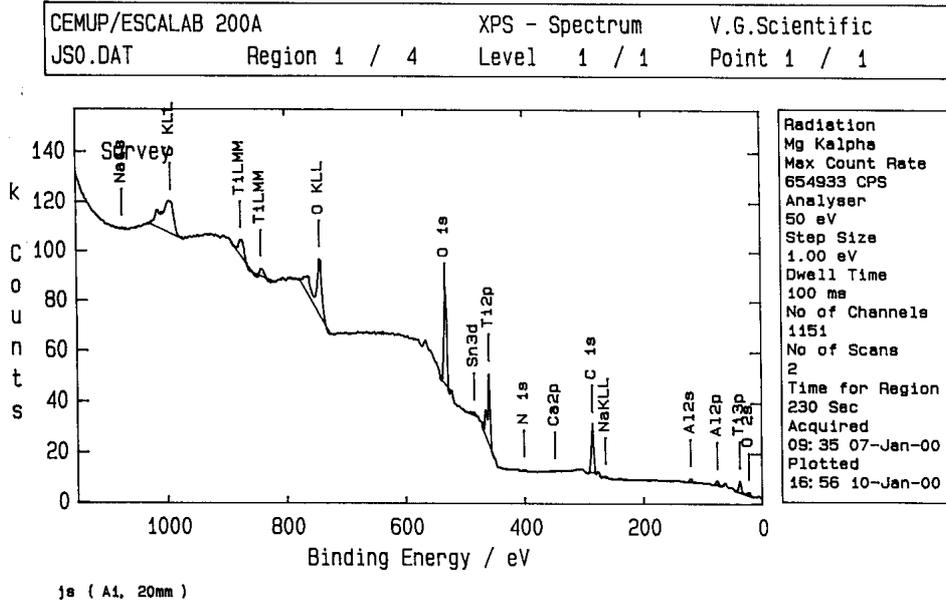


(a) J65-0 – aspecto geral

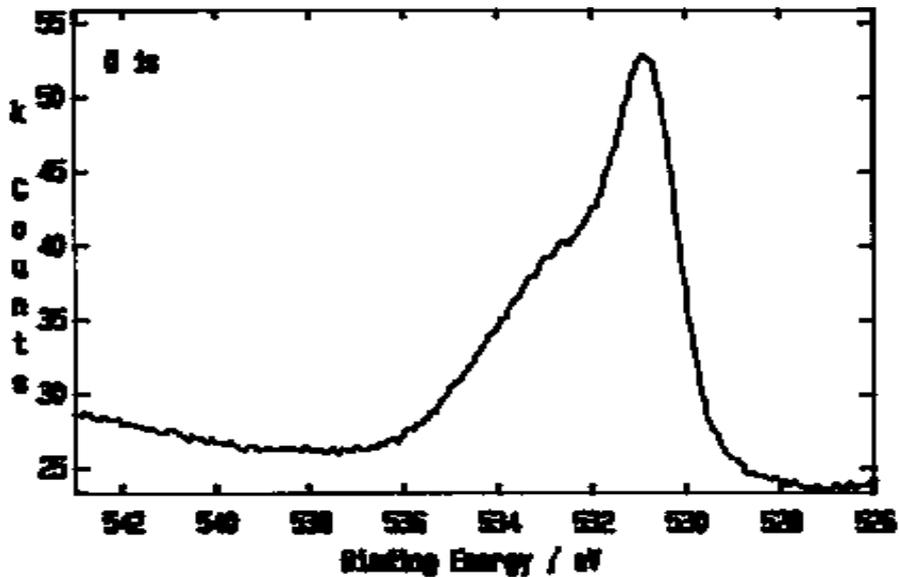


(b) J65-0 - detalhe

Figura IV.5 - Espectros de XPS para as amostras com superfícies jateadas J65_i e os picos associados ao oxigênio.

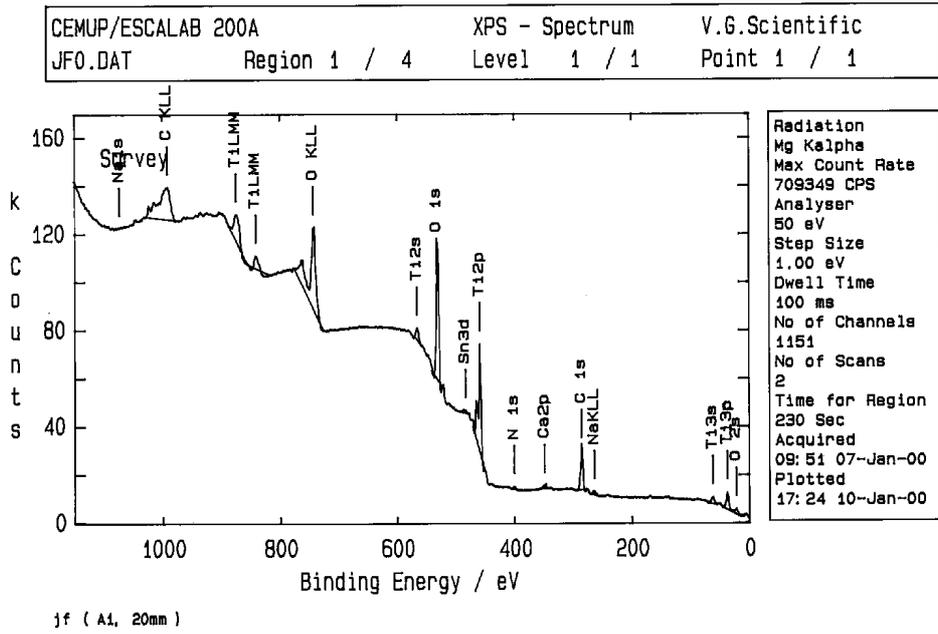


(c) J65-S – aspecto geral

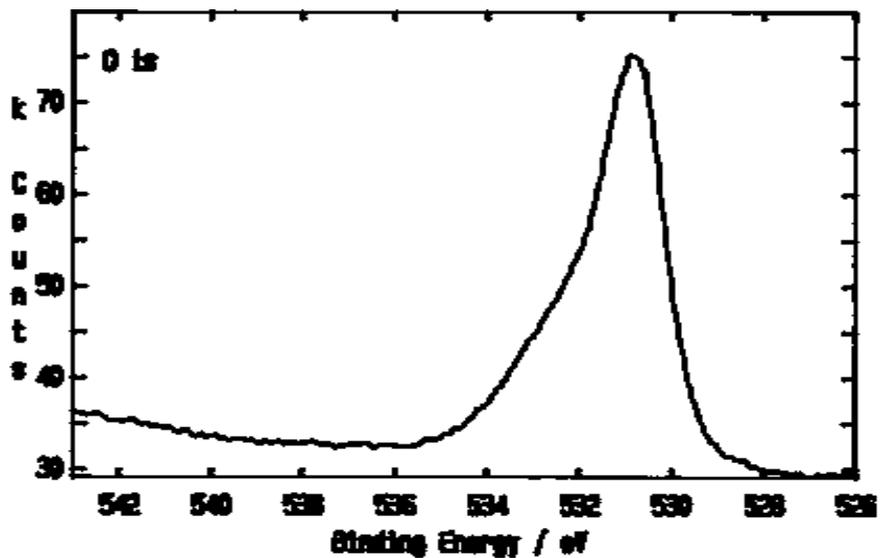


(d) J65-S - detalhe

Figura IV.5 - Espectros de XPS para as amostras com superfícies jateadas J65_i e os picos associados ao oxigênio (continuação).

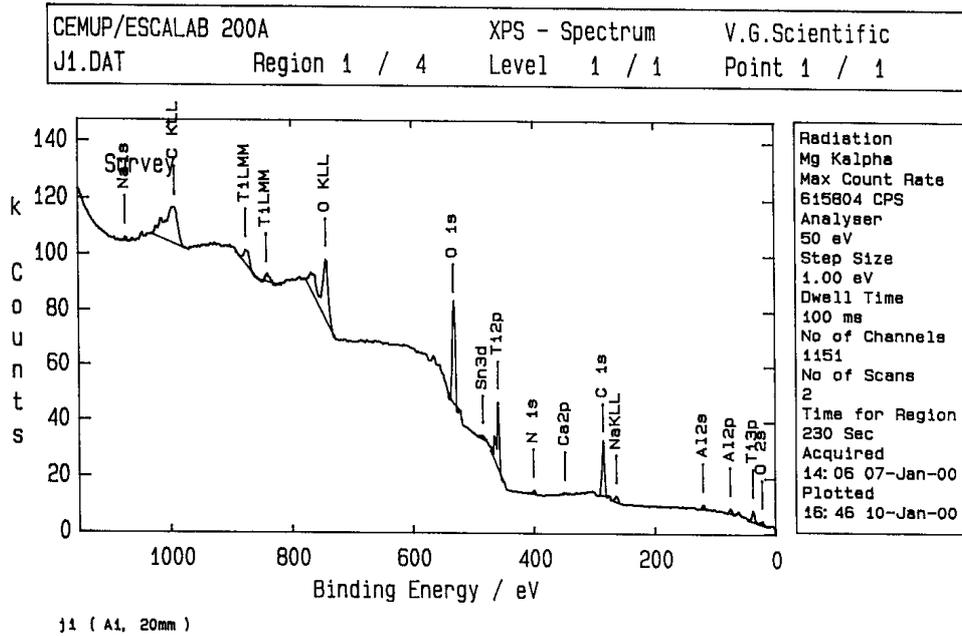


(e) J65-F – aspecto geral

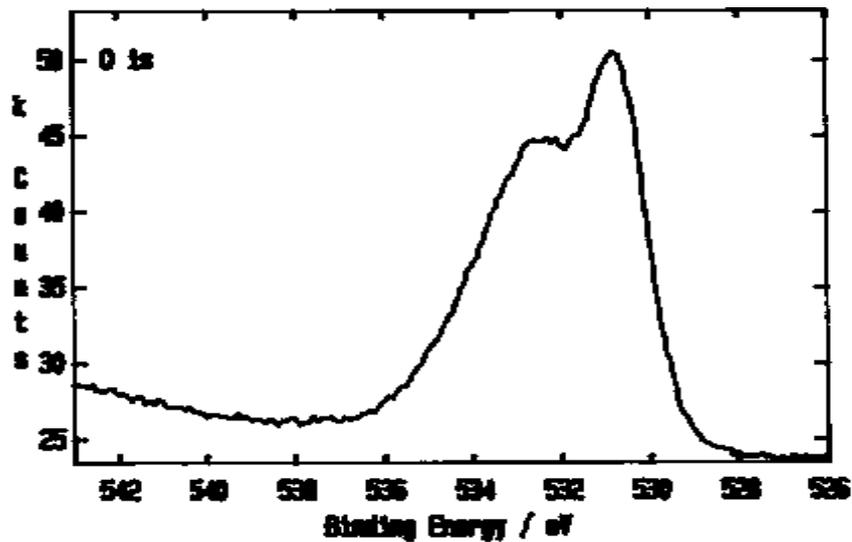


(f) J65-F - detalhe

Figura IV.5 - Espectros de XPS para as amostras com superfícies jateadas J65; e os picos associados ao oxigênio (continuação).



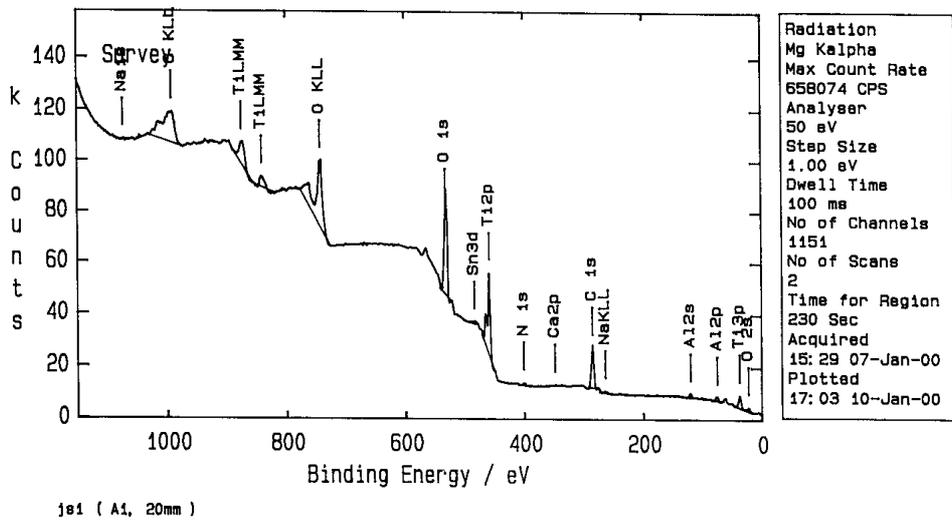
(a) J250-0 – aspecto geral



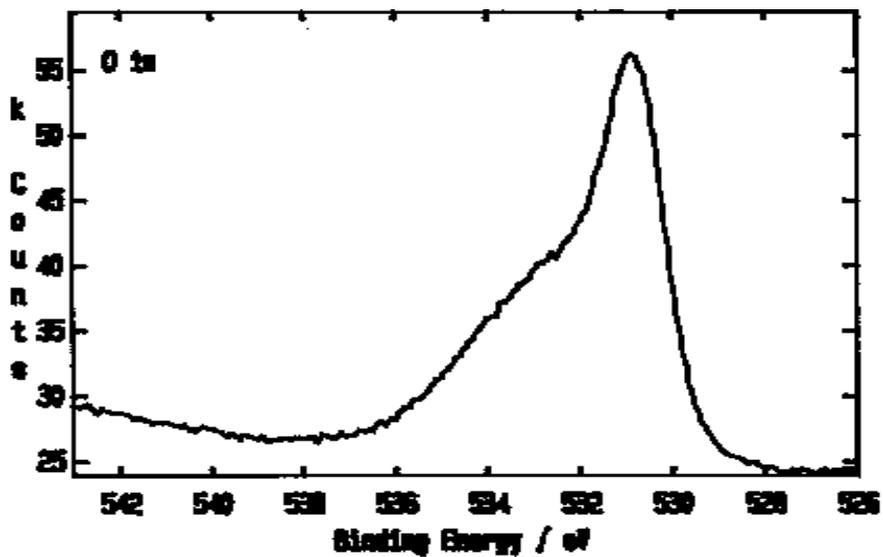
(b) J250-0 - detalhe

Figura IV.6 - Espectros de XPS para as amostras com superfícies jateadas J250, e os picos associados ao oxigênio.

CEMUP/ESCALAB 200A	XPS - Spectrum	V.G.Scientific
JS1.DAT	Region 1 / 4	Level 1 / 1
		Point 1 / 1

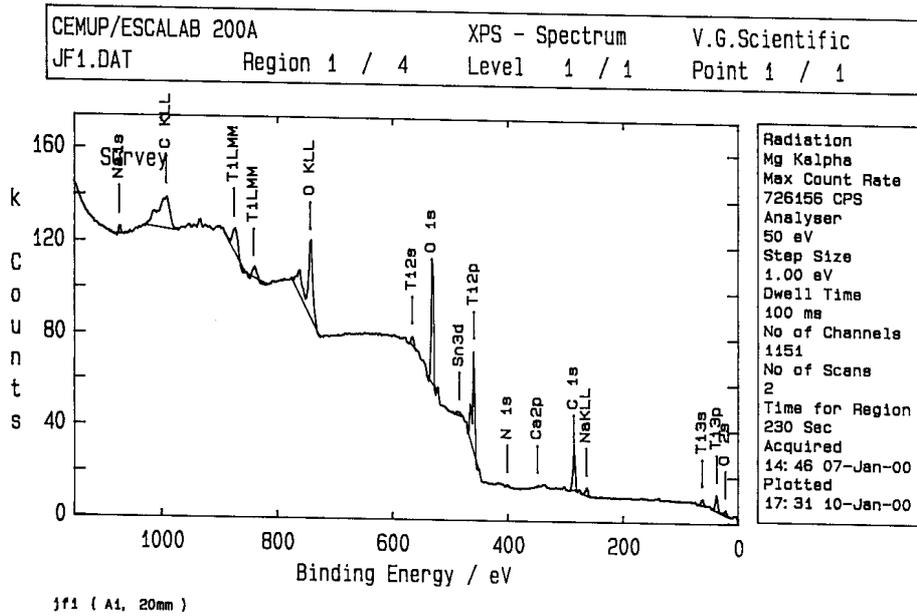


(c) J250-S – aspecto geral

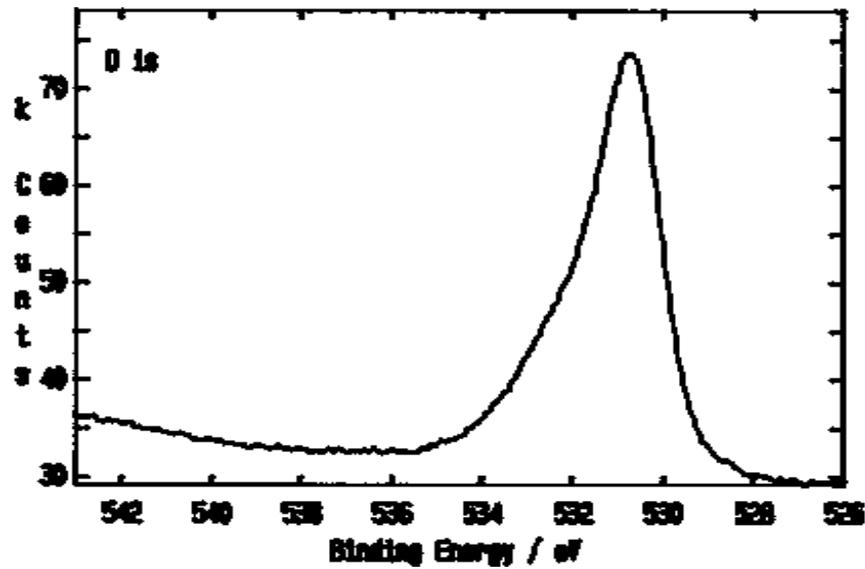


(d) J250-S - detalhe

Figura IV.6 - Espectros de XPS para as amostras com superfícies jateadas J250, e os picos associados ao oxigênio (continuação).



(e) J250-F – aspecto geral



(f) J250-F – detalhe

Figura IV.6 - Espectros de XPS para as amostras com superfícies jateadas J250, e os picos associados ao oxigênio (continuação).

Tabela IV.4 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SUPERFÍCIE DAS AMOSTRAS (% atômica).

Amostra	C	Al	Ti	O	N
L0	41,79	—	13,53	42,93	1,75
LS	49,42	—	11,33	35,97	3,28
LF	42,82	—	13,75	41,57	1,86
J65-0	44,95	10,53	6,11	36,74	1,67
J65-S	44,65	9,02	9,27	36,22	0,84
J65-F	41,1	—	14,53	43,06	1,31
J250-0	45,89	7,59	7,71	37,99	0,82
J250-S	41,14	7,04	11,17	39,34	1,31
J250-F	42,26	—	15,01	42,73	—

IV.3 TESTES BIOQUÍMICOS

IV. 3.1 VIABILIDADE / PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os resultados referentes aos testes de proliferação celular pelo método bioquímico de MTT nas culturas de controle e nas culturas sobre os materiais analisados são apresentados na Figura IV.7.

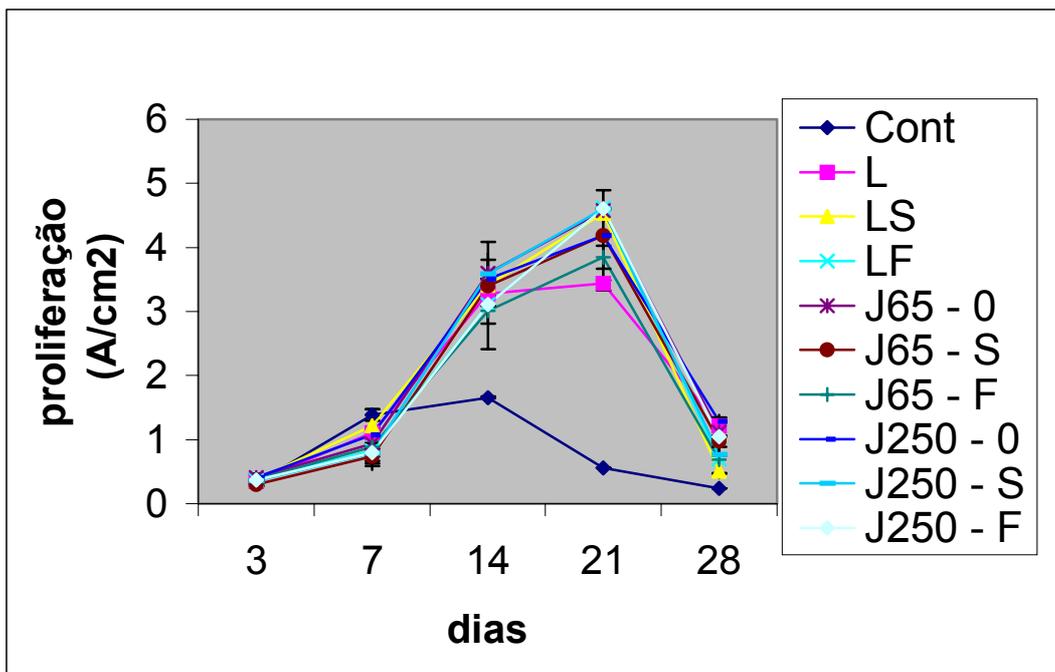


Figura IV.7 – Viabilidade / Proliferação das células (Absorbância / cm²) com origem na medula óssea humana cultivadas sobre material de controle (cont) e sobre os materiais testados (L_i, J65_i e J250_i).

IV.3.2 – ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA

Os resultados referentes aos testes bioquímicos de atividade da fosfatase alcalina (ALP “activity”) nas culturas de controle e nas culturas crescendo sobre os materiais testados são apresentados na Figura IV.8.

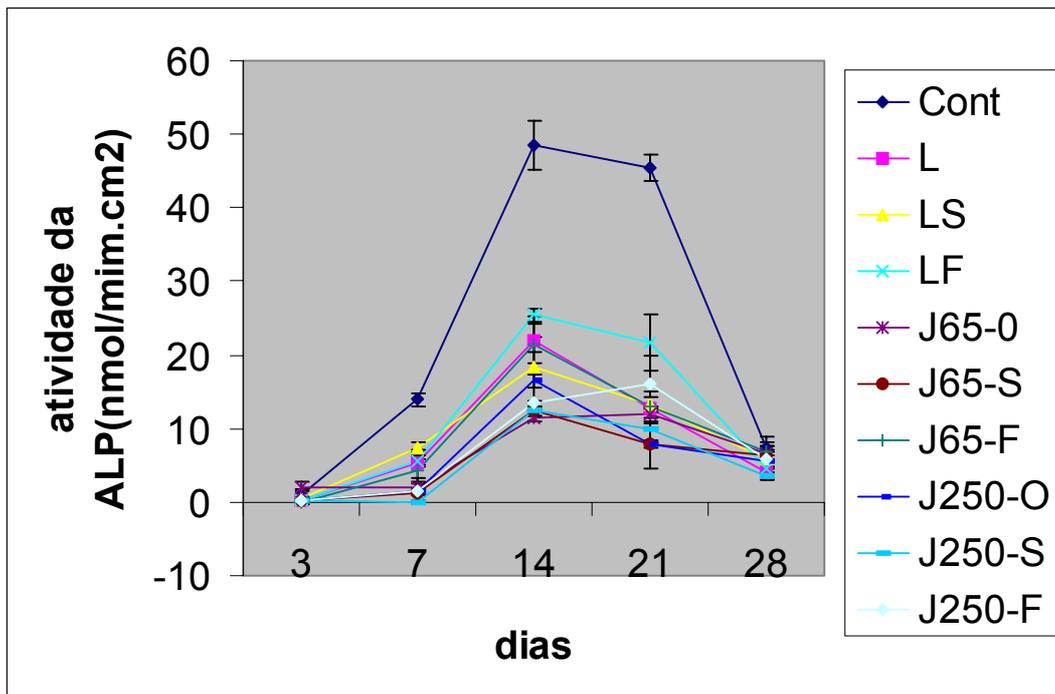


Figura IV.8 – Atividade da fosfatase alcalina (ALP) das células com origem na medula óssea humana cultivadas sobre material de controle (cont) e sobre os materiais testados (L_i, J65_i e J250_i).

IV.4 MORFOLOGIA CELULAR

As citomorfologias obtidas nas etapas iniciais de adesão das células sobre os substratos analisados estão apresentados pelas imagens obtidas em MEV (SE) para os períodos de incubação de 4, 7, 24 e 72 horas, respectivamente nas Figuras IV. 9 a IV.12.

As Figuras IV. 13 e IV. 14 apresentam as imagens obtidas em MEV (SE) para as culturas celulares sobre os materiais testados em períodos de incubação mais avançados, respectivamente 21 e 28 dias de cultura, já confluentes e cobrindo as superfícies substratos, em monocamadas ou multicamadas em algumas poucas partes, misturadas à matriz extracelular.

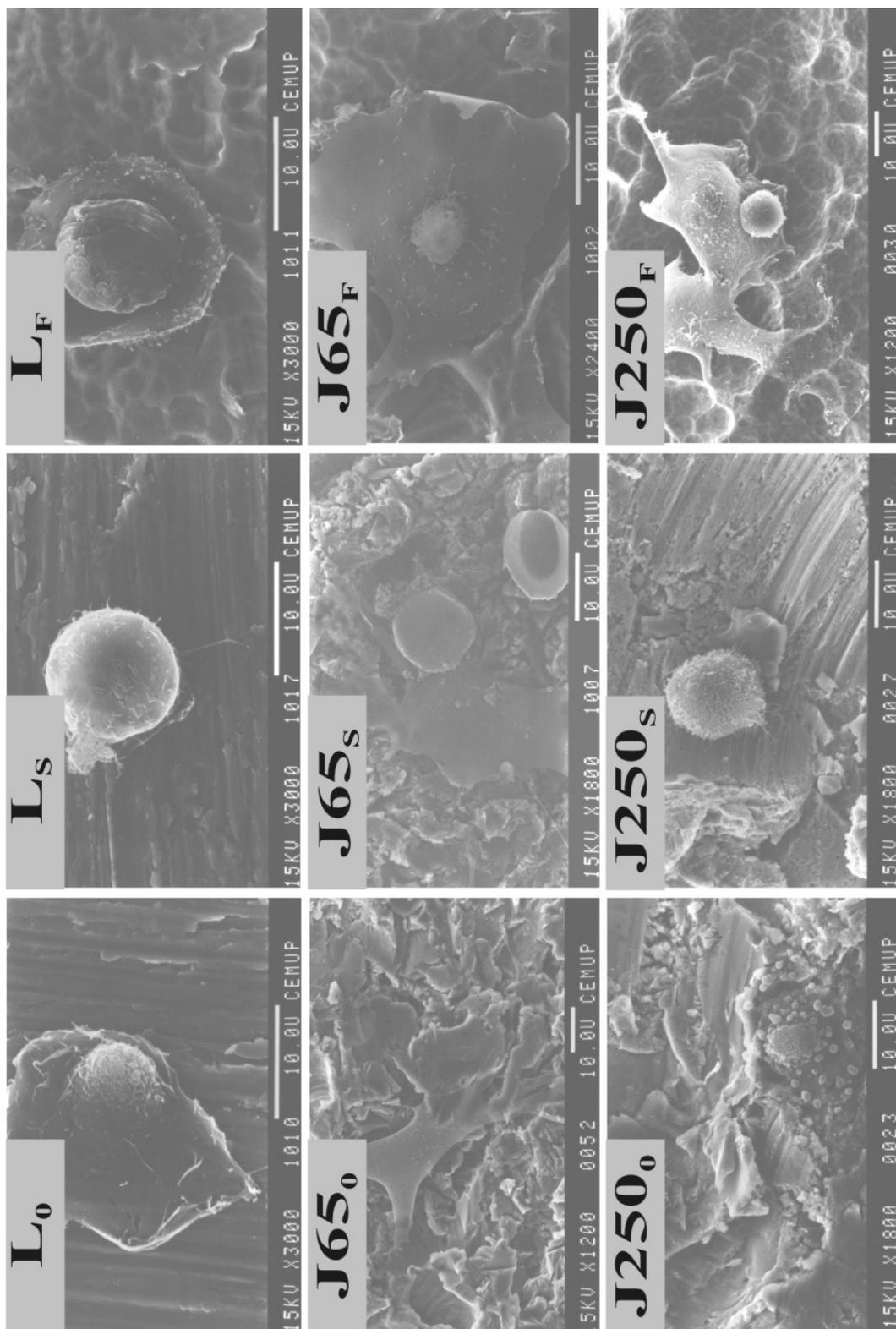


Figura IV.9 - As morfologias celulares obtidas no período de incubação de **4 horas** sobre os materiais testados (SE).

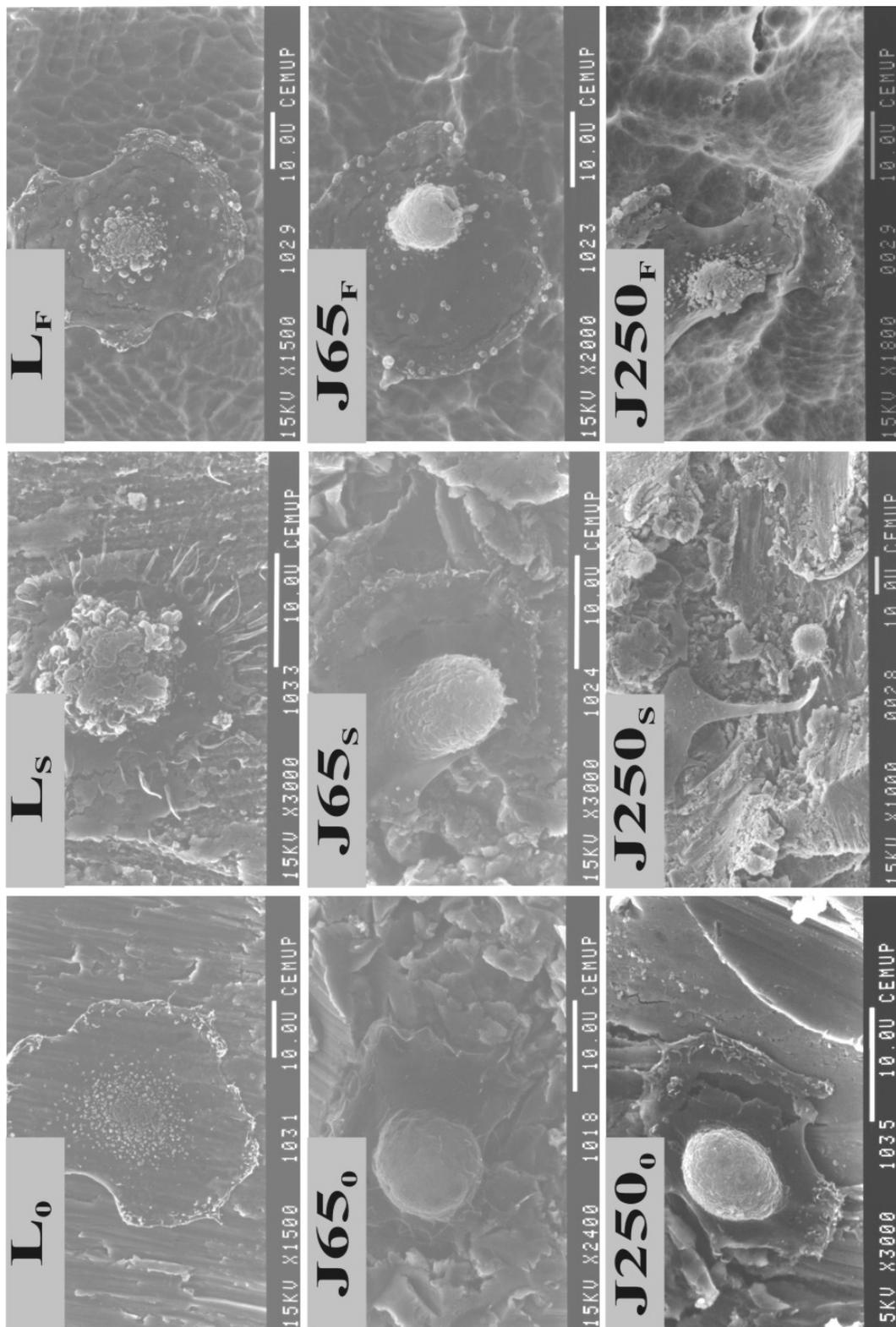


Figura IV.10 - As morfologias celulares obtidas no período de incubação de 7 horas sobre os materiais testados (SE).

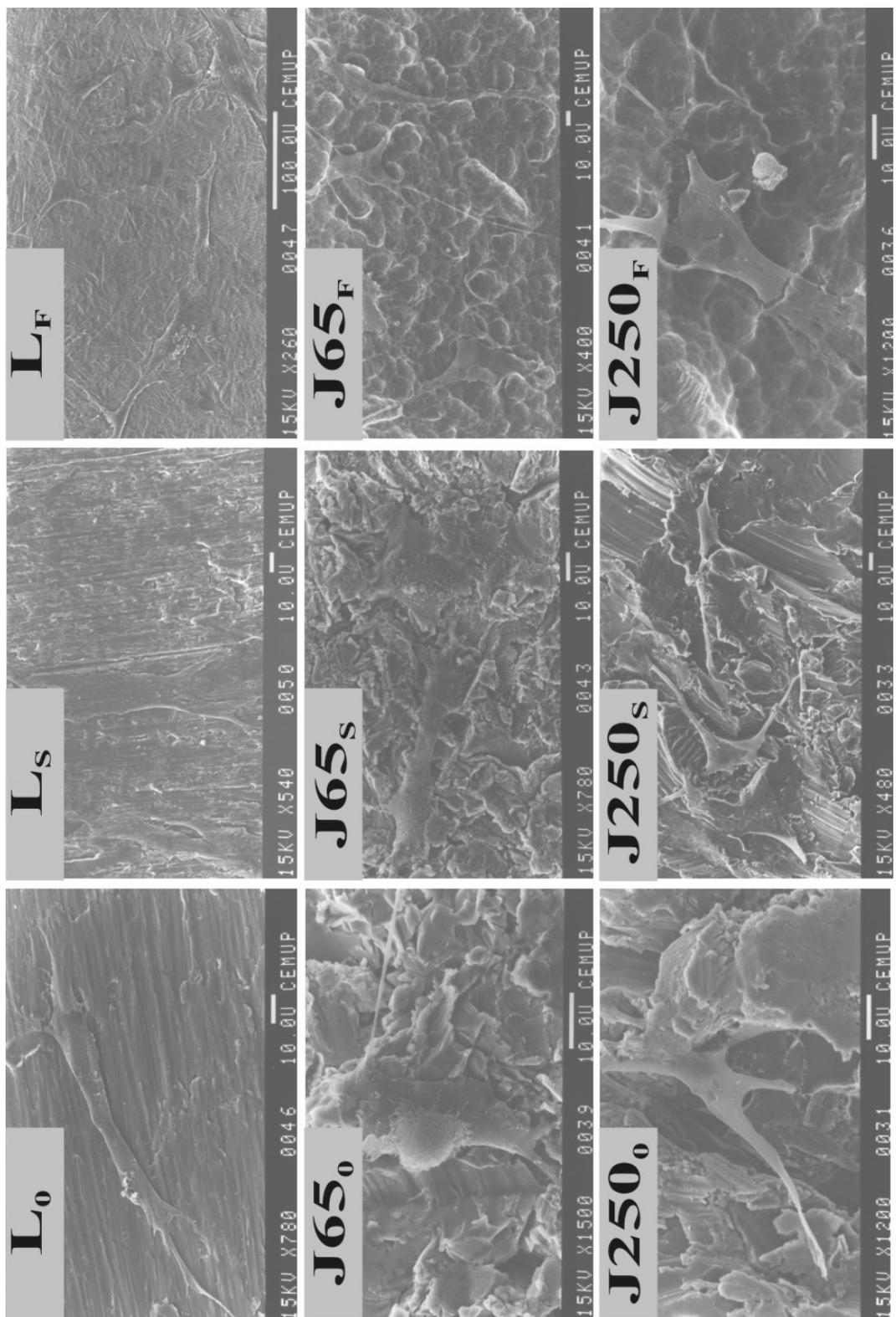


Figura IV.11- As morfologias celulares obtidas no período de incubação de **24 horas** sobre os materiais testados (SE).

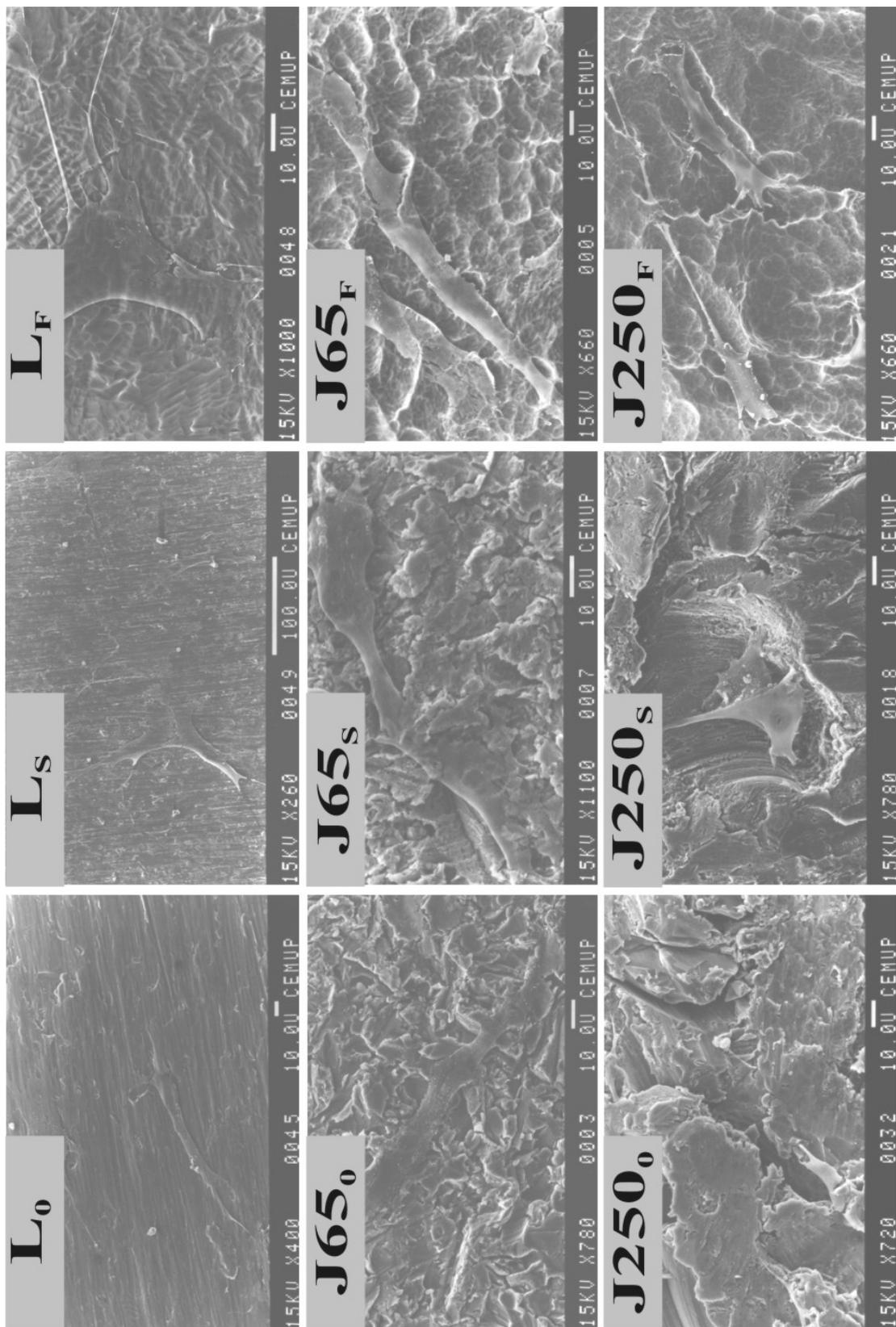


Figura IV.12 - As morfologias celulares obtidas no período de incubação de **72 horas** sobre os materiais testados (SE).

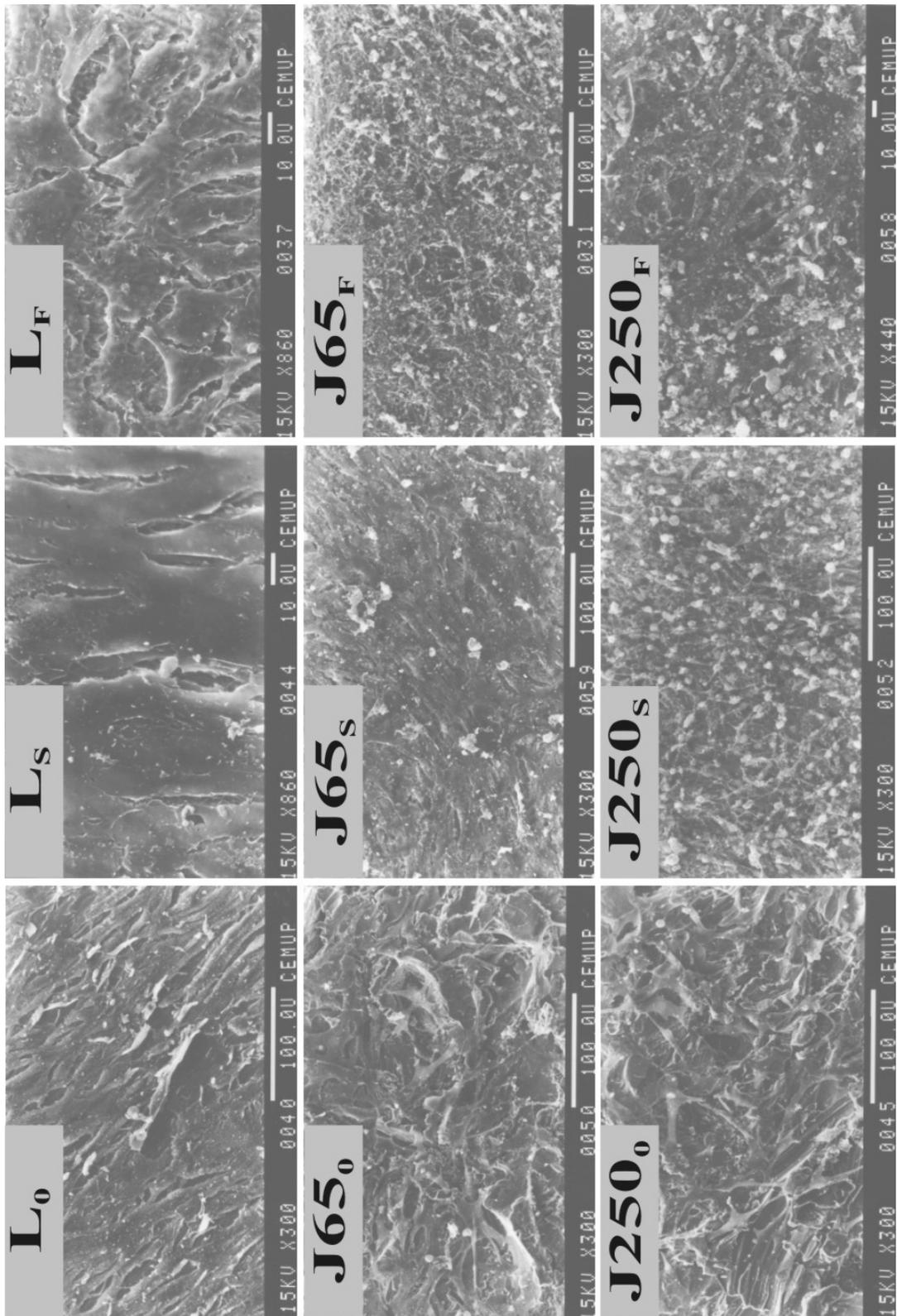


Figura IV.13 - Culturas celulares no período de incubação de **21 dias** sobre os materiais testados (SE).

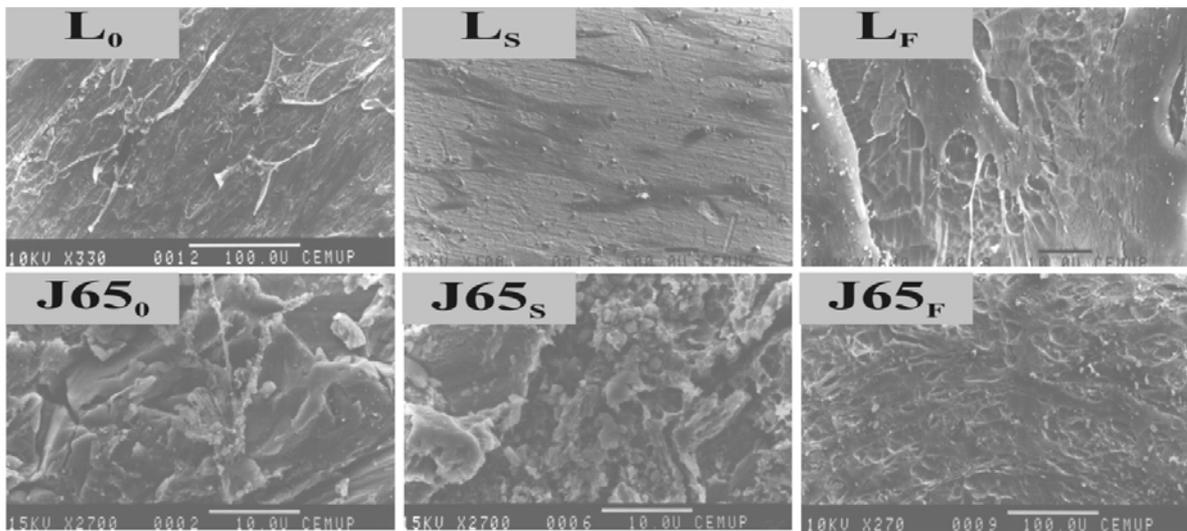


Figura IV.14 - Culturas celulares no período de incubação de **28 dias** sobre os materiais* testados (SE).

(*) Não foram obtidas imagens para os materiais J250, aos 28 dias de incubação das culturas.

CAPÍTULO V – DISCUSSÃO

Primeiramente, são analisados os aspectos dos resultados de caracterização morfológica, química e energética das superfícies estudadas. Seguem-se análises da caracterização biológica do comportamento *in vitro* do ciclo que vai desde o recrutamento de células ósseas da medula humana até à mineralização da matriz extracelular sobre esses materiais e, finalmente, correlacionam-se as respostas biológicas com os resultados de caracterização das superfícies.

V.1 CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL DOS MATERIAIS

Os tratamentos mecânicos produziram três grandes grupos de superfícies, respectivamente L_i , $J65_i$ e $J250_i$, com significativas diferenças de rugosidades médias, especialmente entre os grupos L_i e $J250_i$; os menores valores de R_a foram observados para os materiais lixados e os maiores, para os materiais jateados.

Os parâmetros superficiais de rugosidades médias medidos para todas as superfícies testadas (Tabela IV.1) mostram que ambas as soluções S e F provocaram uma redução em R_a , embora as diferenças observadas dentro de uma mesma família de superfícies não sejam estatisticamente significativas. Todas as superfícies atacadas com a solução S foram as que obtiveram seus valores de R_a com menor variância em torno dos valores médios de R_a , apesar desta solução não ter sido tão efetiva quanto a solução F em alterar a rugosidade média e micromorfologia da superfície.

Alguns trabalhos encontraram bons resultados para superfícies de titânio jateadas com valores de R_a em torno de $1\mu\text{m}$, já outros, mostraram bons resultados em titânio submetido a jateamento abrasivo com rugosidades médias três a quatro vezes maiores, isto é, em torno de 3 - $4\mu\text{m}$. Também existem trabalhos que mostram seus piores resultados com titânio jateado entre 2 - $3\mu\text{m}$ e os melhores com as superfícies lixadas com valores de R_a entre 0,2 – $0,3\mu\text{m}$ [LINCKS et al., 1998; DEGASNE et al., 1999; ANSELME et al., 2000b].

Cabe observar que valores de rugosidade de biomateriais de trabalhos distintos, são de difícil comparação, uma vez que, dependem da escolha do tamanho de uma linha referencial para medição e do operador do equipamento utilizado para a caracterização. Assim, dependendo da escolha feita, uma mesma superfície pode ter valores de R_a bem distintos se forem medidos por equipamentos ou operadores

diferentes. Os valores de R_a oferecem informações relevantes para comparação entre superfícies com microtopografias distintas, mas que tenham sido obtidos por um mesmo operador e num mesmo equipamento, principalmente quando as medições são realizadas mecanicamente. Além disso, não se pode tentar isolar o efeito da rugosidade média sobre o comportamento biológico de osteoblastos, pois, não se busca somente uma faixa de rugosidade adequada, mas também a morfologia que lhe acompanhe.

Os aspectos micrográficos das superfícies L0, J65-0 e J250-0, obtidos pela microscopia eletrônica de varredura (Figuras IV.1 (a) e IV.1 (b)), mostram que as superfícies lixadas apresentam uma morfologia mais suave, com ranhuras provocadas pelo processo mecânico de lixamento. Estas ranhuras com orientação preferencial, ou pequenas marcas superficiais, formam linhas paralelas e de larguras variáveis, sobre uma superfície contendo reentrâncias / saliências provocadas pelo processo de laminação para obtenção das placas de titânio, porém, muito menores do que as encontradas sobre as superfícies submetidas ao tratamento mecânico de jateamento abrasivo; estas últimas, com aspecto morfológico bastante irregular, com muitas reentrâncias e saliências por toda a sua extensão, misturando-se com pequenas áreas planas. Esta irregularidade superficial ficou ainda mais pronunciada nas superfícies jateadas com a maior granulometria das partículas de óxido de alumínio (J250-0). Aspectos morfológicos muito semelhantes, sobre superfícies de titânio lixadas ou jateadas, foram obtidos por BOWERS et al. (1992), LINCKS et al. (1998) e DEGASNE et al. (1999).

O tratamento superficial químico com solução à base de ácido sulfúrico e ácido clorídrico, não se mostrou tão efetivo quanto o tratamento superficial químico à base de ácido fluorídrico na alteração da micromorfologia das superfícies que já tinham sido submetidas aos tratamentos mecânicos (lixamento ou jateamentos abrasivos), apesar da diminuição de algumas saliências.

A solução à base de ácido fluorídrico (F) eliminou a orientação preferencial das ranhuras provocadas pelo lixamento mecânico que podem ser observadas nas superfícies L0 e LS; as marcas de ranhuras de lixamento em LF ficaram com orientação randômica (Figuras IV.1 (a) e IV.1 (b)). Os efeitos de alteração da micromorfologia superficial provocados pelo ataque químico com a solução F foram mais evidentes nas amostras previamente submetidas ao jateamento abrasivo com alumina, pois, em contraste com as superfícies J65-0, J65-S, J250-0 e J250-S que

apresentaram superfícies irregulares com muitos picos e depressões, as superfícies J65–F e J250–F exibiram uma microtopografia mais suave e homogênea, com maior regularidade. As J65–F exibiam pequenas crateras (diâmetros de até 10 μ m) bem distribuídas por toda a extensão superficial; as superfícies J250–F com crateras maiores (diâmetros de até 40 μ m) quando comparadas às de J65–F. A solução S foi pouco agressiva na eliminação dos gumes das superfícies jateadas e portanto, praticamente não provocou alterações morfológicas.

Partículas ricas em alumínio foram identificadas pelo EDS nas amostras somente jateadas ou jateadas e atacadas com a solução à base de ácido sulfúrico e ácido clorídrico, respectivamente as do tipo J65–0, J65–S, J250–0 e J250–S, mas não nas amostras jateadas e atacadas com solução à base de ácido fluorídrico, respectivamente as do tipo J65–F e J250–F. Tais partículas, com tamanhos de 20 μ m ou menos, foram incrustadas na superfície do titânio como consequência do tratamento mecânico de jateamento com alumina e foram facilmente reconhecidas nas imagens de MEV com elétrons retroespalhados, apresentando-se como regiões mais escuras por possuírem menor número atômico, em relação às regiões ricas em titânio, de maior número atômico e que apresentaram-se nestas imagens com uma matriz mais clara (Figuras IV.2 (a) e IV.2 (b)). Pode-se notar que a solução S promoveu uma fragmentação das partículas ricas em alumínio, enquanto que a solução F as eliminou completamente da superfície de titânio, além de ter alterado a microtopografia originalmente criada pelo jateamento abrasivo, com uma suavização das heterogeneidades entre picos e depressões.

Os espectros de XPS para os todos os materiais, identificaram a presença de carbono, nitrogênio e oxigênio. Tais elementos já eram esperados, uma vez que são de fácil adsorção pela superfície do titânio e os mais freqüentemente encontrados em trabalhos de sua caracterização química superficial por espectroscopia com raios-x (Figuras IV.4 a IV.6 – aspecto geral e detalhe em torno do oxigênio).

Para cada uma das 9 condições de superfície analisadas, foi gerada uma camada superficial de óxido de titânio na forma de TiO₂, onde esta forma estequiométrica foi identificada através de um pico de energia de ligação para o oxigênio em torno de 530,4 eV. A presença de uma camada oxidada na forma de TiO₂ também já era esperada, por ser a forma mais comum em que se apresentam as superfícies de implantes de titânio, mesmo quando submetidas a variados tratamentos superficiais.

Todas as investigações para caracterização superficial de implantes de titânio têm apresentado resultados onde a composição química gira em torno do dióxido de titânio (TiO_2), com variações na espessura da camada de óxido dependendo do tratamento utilizado e que geralmente variam entre 2 – 5nm [MARTIN, 1995], com uma taxa de crescimento na referida camada de alguns nanômetros por ano [ONG et al., 1995, 1997; TABORELLI et al., 1997; SÄUBERLICH et al., 1999]. Estes resultados confirmam a estabilidade da camada superficial de óxido de titânio, principalmente quando em contato com fluidos corpóreos.

Ataque eletrolítico tem sido empregado [ZHITOMIRSKY e GAL-OR, 1997; SITTIG et al., 1999] com o intuito de obter-se uma camada de TiO_2 mais espessa e com isso uma melhor resposta biológica do tecido ósseo na superfície metálica, sendo a espessura do óxido dependente das condições experimentais. Os principais parâmetros que afetam a camada de óxido são a diferença de potencial aplicado, a composição do eletrólito e tempo / temperatura. Camadas com espessuras da ordem de dezenas de μm de TiO_2 variando de amorfo a cristalino, de denso a poroso podem ser obtidas [ELLINGSEN, 1998; KASEMO e LAUSMAA, 1991]. A composição final da camada costuma ser uma mistura de óxidos de titânio com diferentes estequiometrias [JONES, 2001]. Implantes dentários com camadas espessas de óxido poroso em sua superfície apresentaram resposta óssea levemente superior, especialmente nas primeiras semanas após a implantação [ELLINGSEN, 1998].

Os espectros de XPS para os materiais jateados, mostram diferenças em torno dos picos de oxigênio e que podem ser melhor observados nas Figuras IV.5 e IV. 6 - (b), (d) e (f) - em torno do detalhe do oxigênio. A presença do alumínio na forma de Al_2O_3 está associada ao pico de energia de menor intensidade, para a de ligação do oxigênio em torno de 532,2 eV com o alumínio que existe sobre as superfícies jateadas e que não foram submetidas ao ataque químico com a solução à base de ácido fluorídrico, isto é, nos materiais J65–0, J65–S, J250–0 e J250–S. A presença do alumínio como resultado de contaminação do jateamento abrasivo corresponde, respectivamente, a 10,5%, 9,0%, 7,6% e 7,0%. A presença destas quantidades de alumínio não inibiu o desenvolvimento das culturas de osteoblastos sobre estes materiais, conforme ainda será discutido.

Os resultados de XPS mostram que a solução S não removeu a contaminação de alumínio, embora tenha reduzido de modo significativo o pico de oxigênio relacionado com a sua presença, provavelmente por ter provocado a fragmentação de suas

partículas, conforme pode-se observar nas Figuras IV.5 (d) e IV.6 (d). No entanto, a solução F mostrou-se eficiente na remoção do contaminante, com uma completa dissolução do óxido de alumínio, confirmado pela presença única do TiO_2 no espectro de XPS para as ligações relacionadas ao oxigênio nas superfícies dos materiais J65-F e J250-F (Figuras IV.6 (f) e IV.7 (f)). Os resultados de XPS estão em concordância com as observações de microscopia e de EDS.

Em todos os espectros de XPS foi identificada uma assimetria no pico de oxigênio situado no entorno de 531 eV, com a formação de um “ombro” lateral. Essa assimetria foi também detectada em outros trabalhos [LEE et al., 1998; MILELLA et al., 2001] que associaram esse “ombro” à presença de OH ácido (531.5 eV) e OH básico (532.6 eV). A presença desses radicais podem advir de adsorção da umidade ambiente ou como consequência do tratamento de superfície (limpeza, ataque químico, esterilização). De acordo com JONES (2001) seria razoável esperar que os substratos tratados com a solução F que contém H_2O_2 apresentassem maior concentração de grupos hidroxila na superfície, o que não ocorreu, uma vez que, as superfícies tratadas com a solução F foram as que apresentaram espectros de XPS com as menores assimetrias laterais associadas aos grupos OH.

Segundo SALGADO et al., (1998) o óxido de alumínio (alumina) é utilizado como material para jateamentos abrasivos, a escolha baseada em menores custos e uma efetiva alteração da microtopografia, apesar de sempre deixar resíduos contaminantes na superfície do implante considerados de difícil remoção, quando não praticamente impossível. Os jateamentos abrasivos com dióxido de titânio evitam a contaminação superficial, porém, são onerosos e, neste caso, a alteração da morfologia superficial com o jateamento abrasivo com alumina pode ser uma alternativa.

Os resultados do parâmetro superficial que avalia, comparativamente, a molhabilidade das superfícies em relação a um certo líquido, isto é, os ângulos de contato θ gerados entre a gota de um líquido específico e as superfícies testadas, mostraram que o aumento de R_a nos materiais provocou um aumento da molhabilidade superficial em relação à este líquido. Assim, para um mesmo líquido, as jateadas do grupo J250_i possuem maior molhabilidade que as J65_i, que por sua vez, são mais “molháveis” que as superfícies lixadas do grupo L_i. Porém, os valores obtidos das tensões críticas superficiais γ_c para cada uma das superfícies testadas, a partir de seus ângulos de contato medidos com dois líquidos distintos, mostraram que as energias mínimas necessárias para a criação de uma unidade de área entre estes sólidos e um líquido

que forme um filme fino e bem aderido com $\theta = 0^\circ$, possuem uma tendência para diminuição de tal energia com a diminuição de R_a . Dentre todas as superfícies, destaca-se a do tipo LF com o menor valor de $\gamma_c = 3,6 \cdot 10^{-3} \text{N/m}$ (Tabela IV.3).

Raros são os trabalhos que estudam as respostas biológicas na interface biomaterial / tecido e que apresentem algum parâmetro relacionado com caracterização energética da superfície. KELLER et al. (1990) apresentam os valores obtidos para os ângulos de contato gerados entre água destilada e deionizada e superfícies de titânio submetidas ao lixamento com lixas de carbetto de silício número 600, submetidas a diversos processos de esterilização. Os valores obtidos mostram que os processos de esterilização podem afetar a energia superficial dos materiais; os ângulos de contato variaram entre $65,1^\circ$ (materiais autoclavados em meio vapor a 121°C) e $33,7^\circ$ (esterilizadas com álcool etílico).

Também estudando processos de esterilização, SMITH (1990) apresenta os resultados de ângulos de contato gerados entre água destilada e deionizada e materiais utilizados para implantes dentários com superfícies lixadas (lixas de SiC número 600). Superfícies de Ti-6Al-4V autoclavadas em meio vapor a 121°C , apresentaram valores médios de $59^\circ \pm 4^\circ$ e já as superfícies de Co-Cr-Mo submetidas ao mesmo processo de esterilização, apresentaram valores médios de $69^\circ \pm 5^\circ$.

Os valores de θ que foram obtidos entre a água destilada e deionizada e as superfícies de titânio lixadas e autoclavadas em meio vapor a 121°C , isto é, superfícies L_i , (Tabela IV.3), variam entre $85,4^\circ$ e $86,5^\circ$, dando uma diferença em torno de 25% dos valores obtidos por KELLER et al. (1990) que testaram um sistema semelhante. Os valores de ângulos de contato medidos são dependentes do operador do equipamento, da rugosidade do material, da presença de heterogeneidades superficiais e etc [RATNER et al, 1996a].

Alguns trabalhos baseiam-se na hipótese de que a energia superficial obtida a partir das medições de ângulos de contato, gera uma faixa ou região ótima de tensões críticas superficiais, em torno de um valor $\gamma_c = 22 \cdot 10^{-3} \text{N/m}$, na qual os biomateriais possuem máxima biocompatibilidade [RATNER, 1996b]. Esta zona hipotética de ótima biocompatibilidade foi gerada por uma série de trabalhos que englobam experimentos com as mais variadas interações de interface biomaterial / tecido, mas, na maioria dos casos, não se conhecem regiões ou valores para estas tensões superficiais críticas

que delimitem a mínima biocompatibilidade, o que sempre levanta discussões a respeito deste conceito.

As equações de regressão que foram utilizadas, podem ser úteis para prever o valor de uma variável, dado um valor determinado da outra variável. Se a reta de regressão se ajusta bem aos dados, então tem sentido utilizar sua equação para fazer previsões, desde que não ultrapassemos os limites dos valores disponíveis. Entretanto, mesmo existindo uma correlação linear significativa entre as variáveis de ângulo de contato (θ) e as tensões superficiais dos líquidos em equilíbrio com seus vapores (γ_{LV}), a equação por regressão linear necessita de muitos pontos (experimentais) para projetar ou prever com menor dispersão, ou com maior precisão, os valores das tensões superficiais críticas (γ_C). Assim, além da água e do glicerol, líquidos que foram utilizados, seria necessário a obtenção dos valores de ângulos de contato gerados entre as superfícies testadas e outros fluidos, com tensões superficiais líquido – vapor bem distintos, para que fossem obtidos valores de tensão crítica superficial mais precisos para as nove condições de microtopografia.

V.2 O COMPORTAMENTO BIOLÓGICO SOBRE AS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

In vivo, o tecido ósseo é irrigado, aloja e protege a medula óssea, formadora de células do sangue e rica em células mesenquimais. O processo de formação do tecido ósseo tem início pela diferenciação de células mesenquimatosas que se transformam em grupos de osteoblastos. Estes sintetizam o osteóide (uma matriz não mineralizada) que logo se mineraliza englobando alguns osteoblastos que se transformam em osteócitos.

Células originárias da medula óssea humana foram cultivadas (primeira subcultura) em uma situação experimental que favorece a expressão fenotípica de osteoblastos. As presenças do ácido ascórbico, β -glicerofosfato e dexametasona nos meios de cultura, favorecem a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos; já confirmado por uma série de estudos de sistemas de culturas ósseas [MARTIN et al., 1993; STEIN et al., 1996; FERNANDES et al., 1997; TOMÁS et al., 1997; MANIATOPOULOS et al., 1998; COSTA e FERNANDES, 2000; COELHO et al., 2000a e 2000b]. Estas condições experimentais favorecem o crescimento de osteoblastos em muitos sistemas de culturas, e no caso dos osteoblastos com origem na medula óssea

humana, uma matriz de colágeno mineralizada pode ser gerada em períodos de incubação de até 4 semanas, o que já foi demonstrado em trabalhos anteriores e também ocorreu neste trabalho. Estas culturas tem sido uma importante ferramenta no estudo das interações entre as células osteoblásticas com biomateriais e seus produtos de degradação [FERNANDES, 1999; FERRAZ et al., 1999, 2001; COSTA e FERNANDES, 2000].

O ácido ascórbico é necessário para a formação e o amadurecimento do colágeno presente na matriz extracelular [MARTIN et al., 1993], o β -glicerofosfato é fonte em potencial de íons fosfato para o processo de mineralização e a dexametasona, um composto que induz a proliferação e / ou a diferenciação das células em osteoblastos [BELLOWS et al., 1992; CHUNG et al., 1992].

As células foram cultivadas por até 28 dias em condições de controle, isto é, em placas de poços plásticas padrão para cultura de células em ausência dos materiais, e sobre as superfícies de titânio preparadas. O acompanhamento do desenvolvimento das células na situação de controle forneceu informações do comportamento da cultura ao longo do tempo, em uma situação já conhecida [COELHO et al., 2000a e 2000b], servindo de parâmetro para comparativo do estado biológico das células que cresciam sobre os materiais testados. As culturas foram avaliadas sob os aspectos da morfologia celular, viabilidade / proliferação, atividade da fosfatase alcalina (ALP “activity”) e a capacidade de formação de depósitos de fosfato de cálcio.

V.2.1 CULTURAS DE CONTROLE

As culturas de controle crescendo sobre as superfícies plásticas padrão para culturas celulares, proliferaram durante as duas primeiras semanas, obtendo valores máximos para o teste de MTT em torno do dia 14, decrescendo após este período. A atividade da fosfatase alcalina, marcador específico da expressão fenotípica dos osteoblastos, cresceu até a segunda semana do período de incubação, atingindo valores máximos também em torno dos 14 dias de cultura, seguindo-se uma fase relativamente estacionária até a terceira semana de incubação, quando então, seus valores começaram a decrescer até o último dia investigado.

As Figuras IV.7 e IV.8 apresentam, respectivamente, o comportamento biológico de todas as culturas avaliadas pelos testes de MTT e de atividade da fosfatase alcalina durante os períodos de incubação testados. Os resultados para as culturas de controle

foram isolados na Figura V.1. Observações feitas através do microscópio eletrônico de varredura (MEV) e do seu sistema acoplado de EDS (“X-ray energy dispersive spectroscopy”) nas culturas de controle aos 21 dias de incubação, mostraram a presença abundante de depósitos minerais contendo P e Ca, disseminados pela matriz extracelular, imagens da matriz extracelular e dos espectros de EDS obtidos para as culturas de controle são aqui apresentados na Figura V.1 (a) e V.1 (b).

Se uma primeira cultura ou ainda uma primeira subcultura é mantida por mais que algumas poucas horas, uma primeira etapa seletiva irá acontecer. As células capazes de se proliferarem irão aumentar, outras ainda irão somente sobreviver mas não irão aumentar em quantidade, e outras tantas serão incapazes de sobreviver sob condições particulares utilizadas. Assim, a relativa proporção das mudanças celulares e da continuidade das culturas, no caso de culturas mononucleares, será dado pela disponibilidade de ocupação do substrato. Após alcançar a confluência, as células normais ficam sensíveis ao aumento da densidade populacional e às limitações de crescimento e irão parar seu processo de divisão [FRESHNEY, 1996]. Para longos períodos de testes, esta redução também pode aparecer como resultado da formação de algumas camadas celulares superpostas, o que causa alguma morte celular e diminuição na proliferação *in vitro*. Este processo começou a partir da segunda semana de incubação para as culturas de controle.

As culturas de controle com origem na medula óssea humana comportaram-se bem, saudáveis e com resultados de um comportamento biológico típico para a morfologia celular, viabilidade / proliferação, diferenciação em osteoblastos e mineralização da matriz extracelular segundo um padrão já observado pelo Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, Portugal [COELHO et al., 2000a e 2000b], garantindo o parâmetro de comparação para o comportamento biológico das células de mesma origem que foram cultivadas sobre os substratos de titânio.

Culturas de Controle

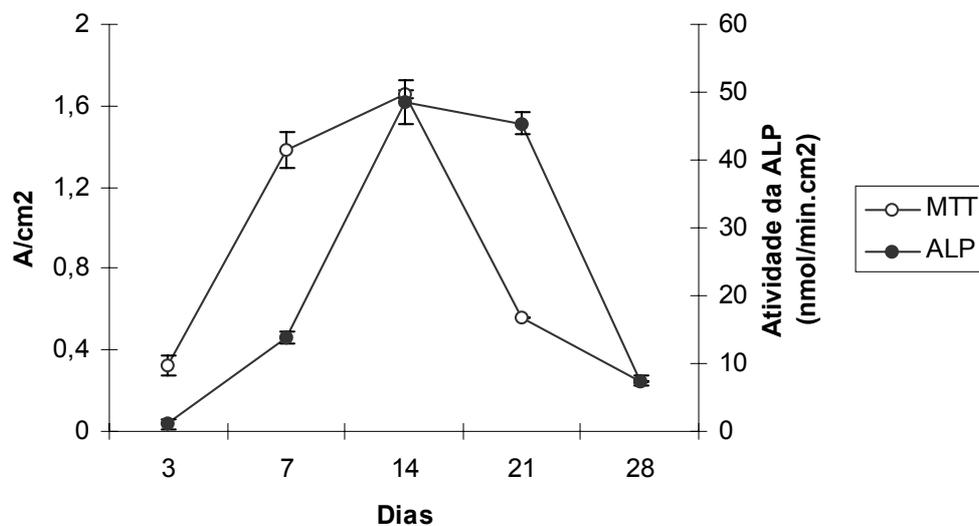


Figura V.1 – Comportamento da viabilidade / proliferação avaliado pelo teste de MTT (A/cm²) e da diferenciação (atividade da fosfatase alcalina, nmol/min.cm²) das culturas de células com origem na medula óssea humana, incubadas nas condições de controle.

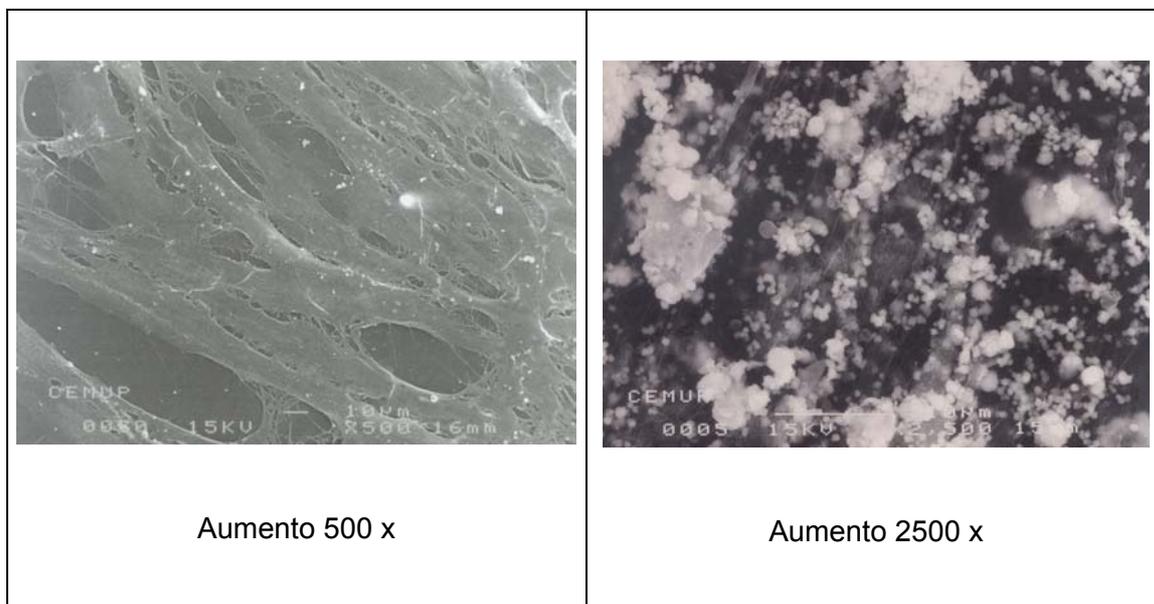


Figura V.1 (a) – Aspectos das culturas de controle aos 21 dias de incubação

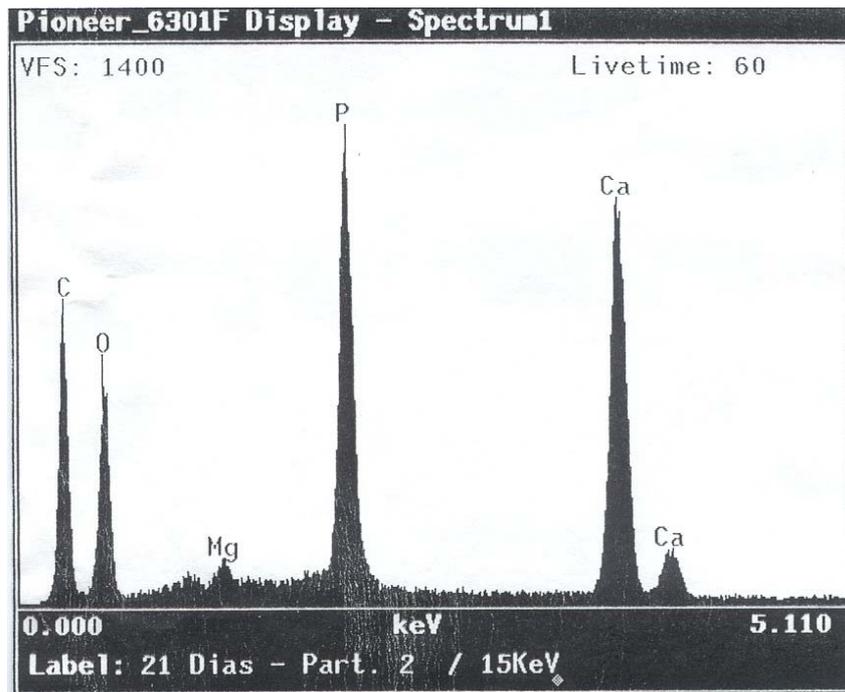


Figura V.1 (b) - Espectro de EDS típico obtido para as culturas de controle aos 21 dias de incubação mostrando as presenças de fósforo e cálcio, em picos significativamente elevados.

V.2.2 CULTURAS SOBRE AS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

V.2.2.1 A ADESÃO CELULAR SOBRE AS DIFERENTES SUPERFÍCIES

As células com origem na medula óssea humana começaram a se aderir e a se espalhar, sobre as todas superfícies testadas, logo após alguns minutos de terem sido semeadas. As observações destas culturas ao microscópio ótico e microscópio eletrônico de varredura, realizadas em vários intervalos de tempo durante as primeiras 24 horas de incubação, mostraram que a expansão do citoplasma começou a ocorrer logo após os 30 minutos até as 4 horas; as células apresentavam uma morfologia típica, com um corpo central esférico e expansões do citoplasma à partir desta área central indo em todas as direções, aderindo-se à superfície adjacente do titânio, em todos os casos. Ao final deste processo, isto é, após as 24 horas iniciais, as células encontravam-se com uma aparência plana, espalhadas e prolongadas sobre as superfícies. A morfologia das células já estendidas e planas foi observada até os 3 primeiros dias de cultura. Este comportamento foi similar em todas as superfícies testadas e pode ser observado pelas imagens apresentadas nas Figuras IV.9, IV.10, IV.11 e IV.12. As microtopografias de todas as superfícies de titânio testadas parecem

não ter inibido o espalhamento das células nas horas iniciais em que se procedem os mecanismos de adesão. O comportamento das células cultivadas sobre as superfícies de titânio durante o processo de adesão foi semelhante ao observado em culturas efetuadas sobre a superfície plástica padrão e já descrito num estudo anterior [COELHO et al., 2000b].

As características superficiais dos materiais, incluindo sua topografia, possuem uma já comprovada influência no processo de adesão de osteoblastos que ocorre após o contato das células com a superfície do material até o seu espalhamento, também na morfologia celular que é gerada nesta adesão; a qualidade dos eventos nestas etapas iniciais irão influenciar as etapas subseqüentes de proliferação e diferenciação destas culturas [ANSELME, 2000]. As mudanças na morfologia celular que ocorrem durante a adesão e o espalhamento, correspondem à reorganização do citoesqueleto e a micromorfologia da superfície interfere nesta reorganização. Já são conhecidos alguns tipos de superfícies que possuem microtopografias que podem provocar a orientação preferencial das células. Tal efeito, dito “guia de contato” também ocorre em osteoblastos, principalmente em culturas não confluentes, onde ainda se permite a observação de células isoladas; colônias celulares mostram-se menos afetadas por esta orientação preferencial [MEYLE et al., 1995; WALBOOMERS et al., 1999].

As células sobre as superfícies lixadas dos grupos L0 e LS parecem estar orientadas pela morfologia superficial destes substratos. Isto foi o que aconteceu para os períodos iniciais de incubação das culturas, onde são observadas células mais isoladas, e até mesmo nos períodos mais prolongados, onde as células estão organizadas paralelamente cobrindo totalmente os referidos substratos. Entretanto, sobre todas as demais superfícies testadas, inclusive a superfície plástica padrão do controle, as células encontravam-se com uma distribuição randômica (Figuras IV.9 à IV.13).

As células se espalharam sobre as superfícies L_i e J65-F com uma maior integração com as referidas superfícies (área de contato), sendo que neste último, as células pareciam acomodar-se bem dentro das pequenas crateras homogeneamente distribuídas pela microtopografia, porém, o mesmo já não ocorreu tão bem para as superfícies jateadas do tipo J65-0, J65-S, J250-0 e J250-S, onde as células se espalharam sobre as superfícies irregulares mas somente mantendo um íntimo contato com as superfícies dos materiais nas extremidades de suas extensões (filopodia) ou nas grandes áreas mais planas que sobre elas existiam, principalmente

nas J250-0 e J250-S. A morfologia das células sobre as superfícies mais irregulares, era um pouco mais para “estrelada “ que em relação às sobre superfícies menos irregulares, devido às emissões de muitas extensões pela membrana celular tentando buscar pontos de apoio sobre as superfícies cheias de picos e depressões.

As geometrias de células mais esféricas, sem ondulações dorsais ou extensões da membrana denotam condições precárias para culturas osteoblásticas, o que não aconteceu durante o processo de adesão e espalhamento das células deste trabalho, para todos os materiais testados, provavelmente, como resultado de uma bem sucedida adaptação destas células, mesmo sobre as superfícies de micromorfologia mais irregular.

V.2.2.2 A VIABILIDADE CELULAR / PROLIFERAÇÃO E A ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA

As células com origem na medula óssea humana proliferaram muito bem sobre todas as superfícies de titânio testadas e o crescimento celular foi significativamente maior que o observado para as culturas de controle. O comportamento sobre as superfícies de titânio foi de um crescimento das populações de células durante aproximadamente três semanas, decrescendo após este período.

A Figura IV.7 apresenta o comportamento biológico de todas as culturas avaliadas pelos testes de MTT durante os períodos de incubação testados. Os resultados de MTT para as culturas incubadas sobre os materiais que não sofreram tratamentos químicos, isto é, L0, J65-0 e J250-0 e os resultados entre os grupos L_i , $J65_i$ $J250_i$, foram isolados nas Figuras V.2 e V.3 (a), (b) e (c), respectivamente. A Figura IV.8 apresenta o comportamento da atividade da fosfatase alcalina para todas as culturas mantidas até o dia 28; os resultados para atividade da ALP nas culturas incubadas sobre os materiais que não sofreram tratamentos químicos, isto é, L0, J65-0 e J250-0 e os resultados entre os grupos L_i , $J65_i$ $J250_i$, foram isolados nas Figuras V.4 e V5. (a), (b) e (c), respectivamente.

Uma comparação entre os resultados referentes às amostras somente submetidas aos tratamentos mecânicos – L0, J65-0 e J250-0, mostra que a proliferação entre os dias 14 e 21 sobre as amostras jateadas foi superior que a proliferação no mesmo período sobre as amostras lixadas, especialmente nas amostras J65-0 no dia 21, com valor médio de proliferação aproximadamente 30% maior que o das amostras L0 (Figura

V.2). Entretanto, a atividade da fosfatase alcalina foi significativamente superior nas culturas sobre os materiais unicamente lixados (Figura V.4).

Os tratamentos com soluções ácidas sobre os materiais lixados (L) resultaram em um evidente aumento na proliferação durante a terceira semana de incubação (Figura V.3 (a)). Entretanto, no caso dos materiais jateados do tipo J65-0, os mesmos tratamentos químicos resultaram em uma pequena diminuição nas taxas de proliferação, expressas pelas variações dos testes de MTT em relação ao tempo e que podem ser observadas no gráfico da Figura V.3 (b) para os materiais J65-S e especialmente para os materiais J65-F. Os tratamentos ácidos sobre as superfícies do tipo J250-0 promoveram aumentos pouco significativos na proliferação durante a terceira semana de incubação, portanto, praticante podendo-se dizer que eles não chegaram a afetar a proliferação celular neste caso.

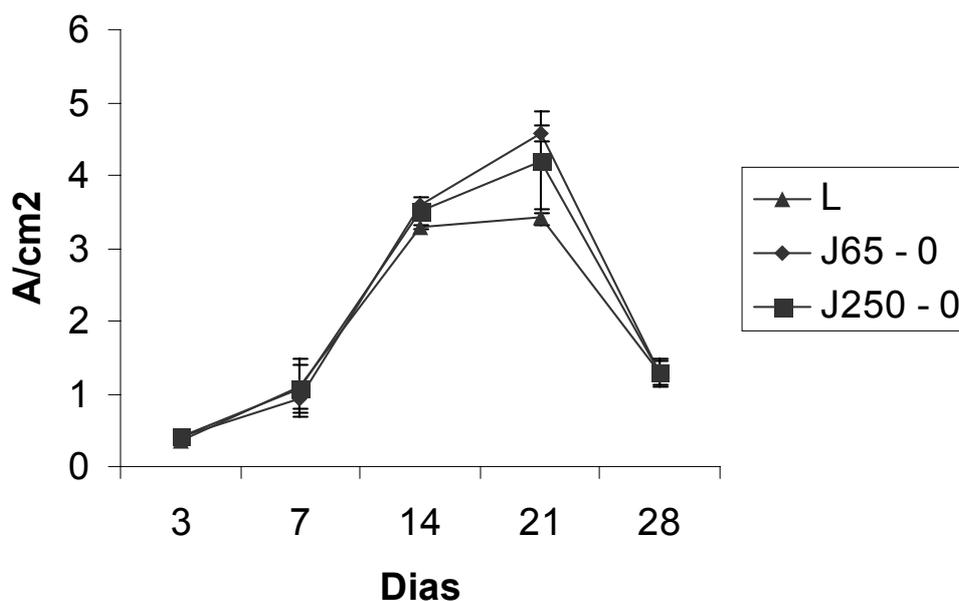


Figura V.2 – Viabilidade celular / proliferação (A/cm^2) das células com origem na medula óssea humana crescendo por 28 dias sobre as superfícies de titânio unicamente submetidas aos tratamentos mecânicos.

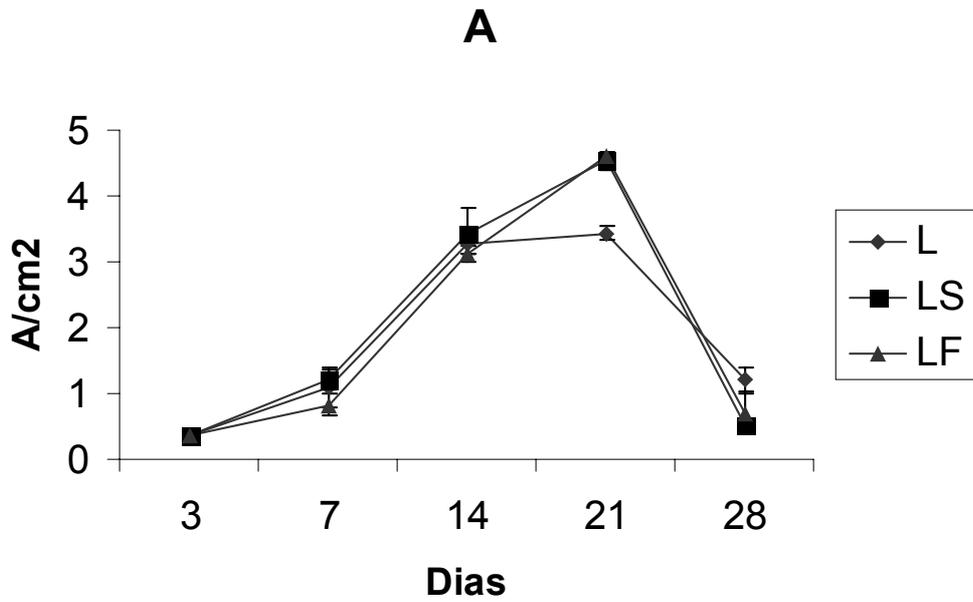


Figura V.3 (a) – Viabilidade celular / proliferação (A/cm^2) das células com origem na medula óssea humana crescendo por 28 dias sobre as superfícies de titânio do grupo L_i .

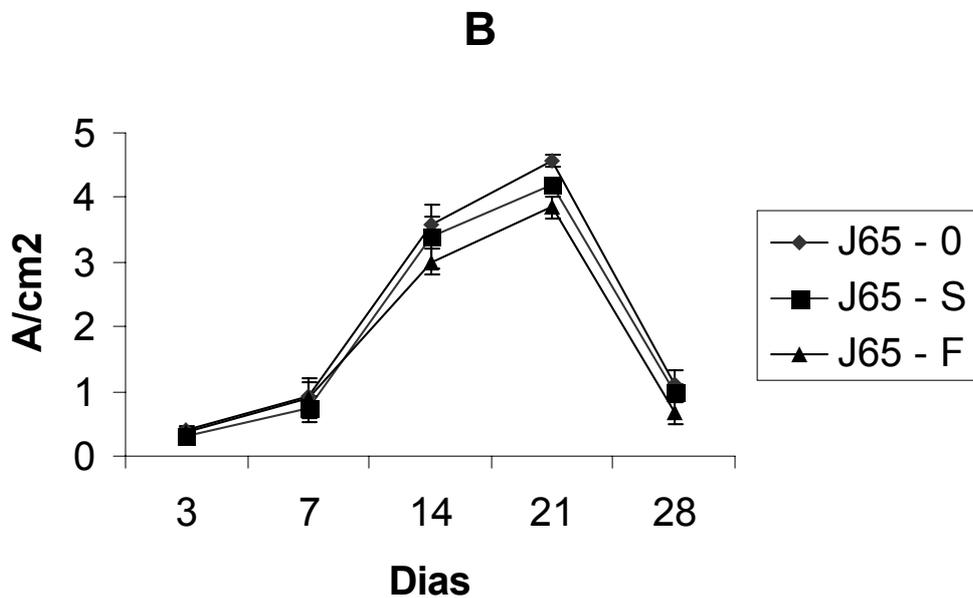


Figura V.3 (b) – Viabilidade celular / proliferação (A/cm^2) das células com origem na medula óssea humana crescendo por 28 dias sobre as superfícies de titânio do grupo $J65_i$.

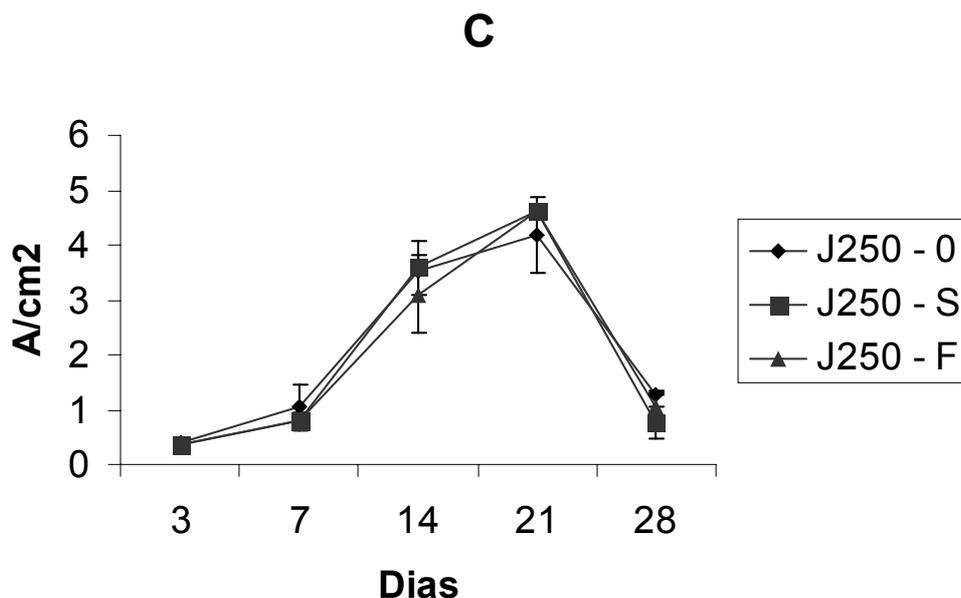


Figura V.3 (c) – Viabilidade celular / proliferação (A/cm^2) das células com origem na medula óssea humana crescendo por 28 dias sobre as superfícies de titânio do grupo J250_i.

A determinação da atividade da fosfatase alcalina para todas as superfícies de titânio testadas, mostrou que os níveis desta enzima foram quase sempre maiores para as amostras da família L_i (Figura IV.8 e V.4). O tratamento das superfícies L, J65-0 e J250-0 com soluções à base de ácido sulfúrico / ácido clorídrico (solução S) não parece ter afetado de modo significativo a atividade da fosfatase alcalina, indicador do grau de diferenciação celular específico para osteoblastos, ao passo que, um evidente aumento dos níveis desta enzima foi observado nas amostras tratadas com solução à base de ácido fluorídrico (solução F) (Figuras V.5 (a), (b) e (c)).

Comparativamente às culturas que cresceram sobre as superfícies plásticas padrão para culturas celulares nas condições de controle positivo, todas culturas que cresceram sobre as superfícies de titânio apresentaram atividades da fosfatase alcalina significativamente menores (Figuras IV.8), portanto, menores níveis desta enzima.

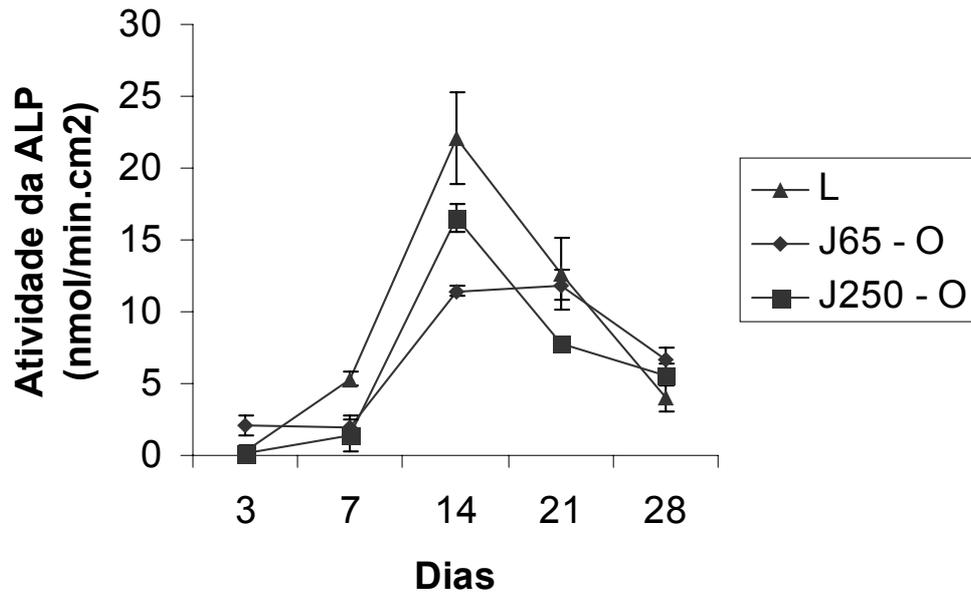


Figura V.4 – Atividade da fosfatase alcalina (nmol/min.cm²) de células com origem na medula óssea humana crescendo por 28 dias sobre superfícies de titânio unicamente submetidas à tratamentos mecânicos.

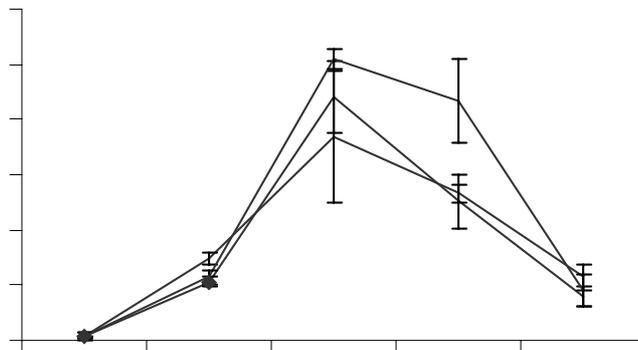


Figura V.5 (a) – Atividade da fosfatase alcalina (nmol/min.cm²) de células com origem na medula óssea humana crescendo por 28 dias sobre superfícies de titânio do grupo L_i.

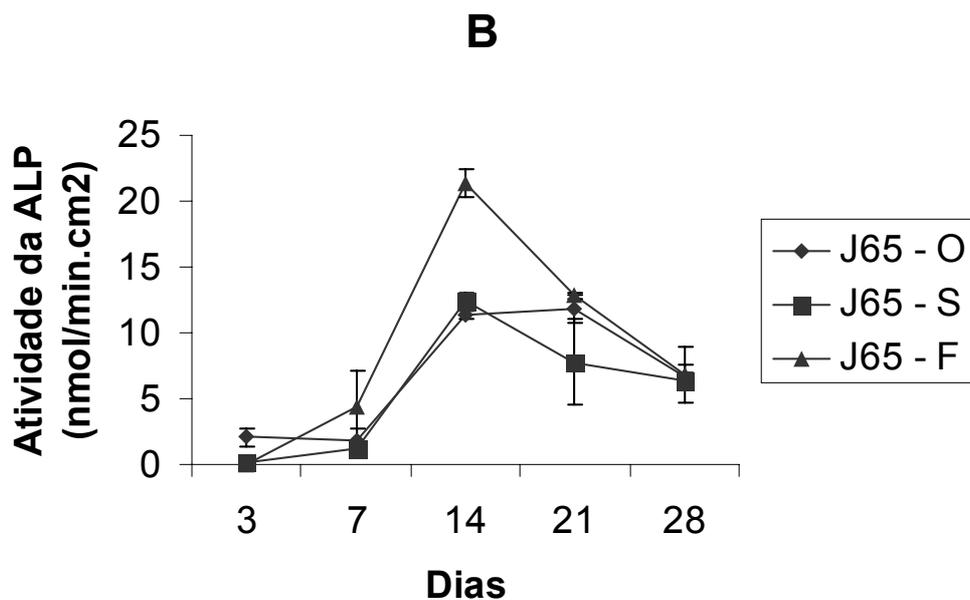


Figura V.5 (b) – Atividade da fosfatase alcalina (nmol/min.cm²) de células com origem na medula óssea humana crescendo por 28 dias sobre superfícies de titânio do grupo J65_i.

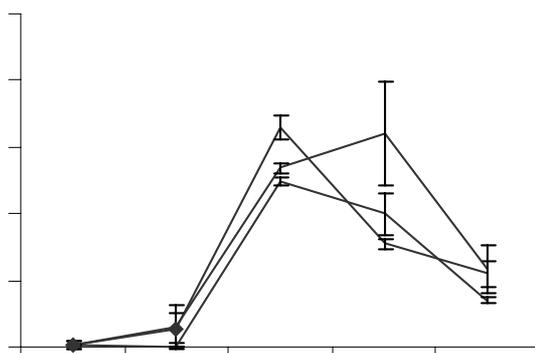


Figura V.5 (c) – Atividade da fosfatase alcalina (nmol/min.cm²) de células com origem na medula óssea humana crescendo por 28 dias sobre superfícies de titânio do grupo J250_i.

V.2.2.3 A FORMAÇÃO DE DEPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO

In vivo, a parte inorgânica ou mineral de um tecido ou matriz óssea, representa cerca de 50% de seu peso. *In vitro* também pode ocorrer a mineralização, caracterizada pela deposição de íons inorgânicos, principalmente fosfato de cálcio, desde que os osteoblastos estejam maduros e ativos para concentrá-los, participando da mineralização da matriz orgânica (colágeno do tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas) [HANCOX, 1972].

O cálcio e o fósforo formam cristais que são caracterizados por técnicas que incluem difração de Raios-x, absorção por infra-vermelho, microscopia eletrônica de varredura e etc. Estes cristais mostram ter a estrutura da hidroxiapatita com a composição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, o aspecto micrográfico da hidroxiapatita biológica obtido por microscopia eletrônica é de cristais sob a forma de agulhas ou tabletes alongados. Os cristais se arranjam ao longo das fibrilas colágenas e são envolvidos por substância fundamental amorfa. Os íons da superfície do cristal de hidroxiapatita são hidratados, existindo, portanto, uma camada de água e íons em volta do cristal.

A Figura IV.13 mostra em imagens obtidas pelo MEV, os aspectos das culturas sobre todas as superfícies de titânio testadas, aos 21 dias de incubação. Observa-se que as superfícies da família L_i estão cobertas pelas camadas de células com uma aparência bastante homogênea, porém, não há evidências da presença de depósitos minerais de fosfato de cálcio ou de que tenha ocorrido a mineralização da matriz extracelular gerada sobre os materiais previamente lixados. Apenas pequenos pontos isolados com a presença de cálcio e fósforo foram identificados pelo EDS (espectros não apresentados).

As superfícies unicamente jateadas, isto é, J65-0 e J250-0, também apresentaram aos 21 dias de incubação das culturas, a presença de muitas células cobrindo estes materiais, em camadas que se estendiam por quase toda a superfície. O aspecto das células nas imagens (Figura IV.13 – superfícies unicamente jateadas), mostra que as células buscaram adaptação por sobre as superfícies irregulares, apresentando numerosas extensões que pudessem aumentar sua estabilidade e as permitisse estar fortemente aderidas, mas apesar disso, não existem evidências da presença de depósitos minerais de fosfato de cálcio.

Ao contrário dos já citados materiais, as superfícies submetidas aos jateamentos abrasivos seguidos de ataques ácidos com as soluções S e F, isto é, os materiais J65-S, J65-F, J250-S e J250-F, apresentam claras evidências da formação de matriz extracelular mineralizada com a presença de inúmeros depósitos minerais de fosfato de cálcio homoganeamente distribuídos por entre as camadas de células que cobriam estas superfícies, aos 21 dias de período de incubação. Comparativamente, as superfícies J65-S mostraram uma menor incidência dos depósitos de fosfato de cálcio que as superfícies J250-S, entretanto, as superfícies J65-F e J250-F mostraram uma aparência similar, uma abundância de matriz extracelular com a presença de numerosos depósitos minerais globulares de fosfato de cálcio (Figura IV.13 – superfícies jateadas e atacadas com soluções ácidas).

A aparência destes depósitos minerais globulares de fosfato de cálcio que entremeavam a matriz extracelular para os materiais J65-F, J65-S, J250-S e J250-F é semelhante aos depósitos de muitos sistemas de culturas biomateriais / osteoblastos com origem na medula óssea humana já anteriormente obtidos e identificados pelo Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, Portugal.

V.3 O EFEITO DA MICROTOPOGRAFIA SOBRE A OSTEOGÊNESE

A formação do tecido ósseo em torno da superfície de um implante requer o recrutamento de células osteoprogenitoras ou células precursoras de osteoblastos, sua proliferação e diferenciação em células com atividades funcionais osteoblásticas que as tornem capazes de mineralizar a matriz extracelular orgânica na região interfacial. Neste processo, conforme apresentado no capítulo II, muitas características da superfície do implante possuem uma importante e já comprovada participação, pois, as células interagem com a superfície do material e modulam seu comportamento biológico como respostas a estas interações, tanto nas situações *in vivo* quanto nas situações *in vitro*. O número de diferentes sistemas que podem ser gerados entre células e superfícies de biomateriais é grande, bem como o número de parâmetros que podem influenciar o processo; as dificuldades intrínsecas a estes sistemas fazem com que ainda pouco se saiba sobre como as superfícies modulam o comportamento celular, incluindo a adesão, o crescimento e suas atividades funcionais.

As interações iniciais começam com a adsorção pela superfície do material de moléculas biologicamente ativas, incluindo as proteínas que irão se ligar às células e que participam da adesão celular e de seu espalhamento e, em seguida, das etapas sucessivas de crescimento e de suas funções específicas [ANSELME, 2000]. As características superficiais do biomaterial podem influenciar no tipo, na quantidade e na arrumação das proteínas adsorvidas e, conseqüentemente, no comportamento nas fases subseqüentes do desenvolvimento do tecido e na secreção protéica da matriz extracelular.

Para todos os materiais testados, as células tiveram um processo de adesão em mesmo tempo e com a obtenção de morfologias similares de osteoblastos aparentemente saudáveis e bem adaptados às diferentes microtopografias, com uma orientação preferencial sobre as superfícies lixadas do tipo L0, LS e uma distribuição randômica em todas as demais.

Os resultados relativos aos testes de MTT que avaliam a taxa de proliferação celular, mostraram que a proliferação atingiu maiores valores e por durante períodos mais longos para os materiais submetidos unicamente ao jateamento abrasivo, quando comparados aos materiais unicamente lixados (Figura V.2). Este resultado sugere que a proliferação é afetada e favorecida pelo aumento da rugosidade das superfícies, em concordância com diversos trabalhos (Capítulo II, itens II.3 e II.5.1). Entretanto, é possível que as maiores taxas de proliferação por maiores períodos, obtidas para as superfícies mais rugosas, sejam devido às suas maiores áreas superficiais efetivas e, portanto, uma maior disponibilidade de espaço para o aumento da proliferação em culturas mantidas por longos períodos.

Os resultados para a atividade da fosfatase alcalina, ao contrário da proliferação, foram superiores para os materiais unicamente lixados quando comparados aos materiais unicamente jateados (Figura V.4), sugerindo uma menor expressão fenotípica osteoblástica para as culturas sobre estes últimos. Este comportamento pode estar relacionado com as maiores taxas de proliferação mantidas até maiores tempos, observadas para os materiais jateados, como uma recíproca relação entre a proliferação e a diferenciação que tem sido descrita durante o desenvolvimento fenotípico de osteoblastos, isto é, eles só começam a se diferenciar de modo expressivo quando as taxas de proliferação começam a diminuir e a confluência das culturas ainda não foi atingida [STEIN et al., 1996]. No caso das culturas sobre os materiais jateados do tipo J65-0 e J250-0, as taxas de proliferação só diminuíram de

modo significativo após períodos já prolongados de incubação, aos 21 dias, diferentemente do que aconteceu para os materiais L0, que já começaram a decrescer as taxas de proliferação significativamente aos 14 dias de incubação, antes da confluência de suas culturas.

As superfícies LS e LF obtiveram maiores taxas de crescimento e por maiores períodos que as superfícies L0, provavelmente devido às modificações na morfologia da superfície originalmente lixada que os ataques químicos provocaram e / ou um aumento da área superficial efetiva, parâmetros que influenciam a proliferação celular (Figura V.3 (a)).

Os tratamentos químicos não resultaram em diferenças significativas sobre as taxas de proliferação celular sobre os materiais jateados, conforme pode ser observado nas Figuras V.3 (b) e (c), respectivamente para os grupos J65_i e J250_i. Os materiais jateados (com ou sem tratamentos químicos) já possuem área superficial efetiva maior que os materiais lixados e talvez isso explique porque os tratamentos químicos sobre os materiais da família L_i tenham resultado em efeitos mais sensíveis sobre a proliferação.

É importante realçar que o já citado comportamento da maior atividade da fosfatase alcalina para os materiais que começaram a diminuir de modo mais brusco suas taxas de proliferação com menores períodos de incubação (Figuras V.2 e V.4), parecer ser controlado pelo parâmetro rugosidade, pois, ele não foi observado dentro dos grupos de materiais com rugosidades bem próximas, porém, morfologias distintas, isto é, dentro das famílias L_i, J65_i e J250_i, especialmente as tratadas com a solução F, com morfologias bem distintas das demais de seu grupo (Figuras V.5 (a), (b) e (c)). Nota-se que dentro de cada uma das respectivas famílias de superfícies, as amostras tratadas com solução à base de ácido fluorídrico apresentaram as maiores atividades da fosfatase alcalina, um importante marcador da diferenciação osteoblástica [AUBIN e LIU, 1996].

As nove superfícies também foram avaliadas a respeito de suas influências sobre a capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada, o último evento da diferenciação osteoblástica e essencial para a osteointegração do implante, isto é, a formação de um tecido ósseo integrado com o biomaterial numa interface saudável. Muitos trabalhos avaliam somente algumas etapas dos sistemas de culturas osteoblásticas, geralmente as de adesão e proliferação, devido às dificuldades

intrínsecas da manutenção de culturas por longos períodos, necessários para a observação de possíveis formações minerais como produto de intensa atividade de osteoblastos; já se sabe que a microtopografia da superfície pode atuar de maneiras diferentes em cada uma das etapas, portanto, uma superfície que incentiva a diferenciação, não necessariamente irá mineralizar a matriz extracelular [DE SANTIS et al., 1996; FERRAZ et al., 1999, 2001; ANSELME et al., 2000b,].

Maiores padrões comportamentais são observados nas etapas finais dos ciclos de cultura. A família L_i de superfícies não mostrou a formação de depósitos minerais e o mesmo comportamento foi obtido para as superfícies J65-0 e J250-0. Somente as superfícies jateadas e posteriormente submetidas aos tratamentos químicos ácidos levaram as culturas de células com origem na medula óssea humana até a mineralização, isto é, até a formação de matriz extracelular com depósitos minerais; especialmente as culturas incubadas sobre as superfícies que foram atacadas com a solução F. Estes resultados mostram que as superfícies jateadas que foram submetidas aos ataques ácidos apresentaram influências mais positivas sobre as culturas e sobre seu comportamento biológico, no que diz respeito à capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada, uma vez que, as superfícies lixadas e submetidas aos mesmos tratamentos ácidos não o fizeram.

As famílias de amostras submetidas ao lixamento (L_i) ou aos jateamentos abrasivos (J65_i e J250_i) apresentaram diferentes faixas de rugosidades médias (Tabela IV.1) e muitos estudos sugerem que o aumento da rugosidade favorece a diferenciação osteoblástica *in vitro* [LINCKS et al., 1998] e também *in vivo*, com favorecimento da obtenção da maturidade fenotípica, além de incentivos na produção de certas citocinas e fatores de crescimento pelos osteoblastos imediatamente em contato com as superfícies, ambas substâncias que participam da formação do tecido ósseo [KIESWETTER et al., 1996].

Outra observação interessante é a de que as superfícies J65-S apresentaram uma baixa capacidade de indução de formação de depósitos minerais, quando comparadas às superfícies J250-S. Ambas possuem rugosidades distintas, porém, composições químicas e micromorfologias superficiais similares; tal comportamento podendo estar então, relacionado às diferenças de rugosidade (valores de R_a para as superfícies J250-S maiores que os valores de R_a para as superfícies J65-S). Entretanto, este comportamento não foi observado para os materiais J65-F e J250-F, onde as superfícies J65-F, com menores valores de R_a , também obtiveram resultados de uma

abundante presença de cristais na matriz extracelular, tal como as das superfícies J250-F. Já as superfícies J65-0 e J250-0, com rugosidades R_a distintas, com valores respectivamente próximos às rugosidades de J65-F e J250-F, com micromorfologias superficiais similares e não tendo sido submetidas a tratamentos químicos ácidos, não conseguiram a formação de matriz extracelular mineralizada. Estes resultados sugerem que, tal como em outras investigações, não só o parâmetro rugosidade mas também a morfologia da superfície deve ser levada em conta na consideração de um acabamento superficial e na sua influência sobre a performance biológica na interface tecido / biomaterial [CASTELLANI et al., 1999].

A insuficiente mineralização observada nas culturas que cresceram sobre os materiais lixados (L_i) e nos materiais J65-0 e J250-0, pode estar relacionada com as suas características superficiais que não favoreceram a formação de uma matriz extracelular em quantidade e / ou qualidade que sustentasse o processo de mineralização [STEIN et al., 1996].

V.4 O EFEITO DE POSSÍVEIS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO PROVOCADAS PELOS ATAQUES ÁCIDOS

Submeter o titânio e suas ligas a tratamentos químicos superficiais na procura de condições que induzam melhores respostas biológicas, tal como uma maior osteointegração ao implante, já tem sido o objetivo de alguns trabalhos [YAN e DAVIES, 1998; NISHIGUCHI et al., 1998; WEN et al., 1998].

Testes que avaliavam somente a influência de diferentes técnicas de limpeza e esterilização e não a morfologia da superfície, para implantes de titânio polidos inseridos em tíbias de cães, mostraram que a resistência oferecida para a retirada dos mesmos, na interface implante / tecido ósseo, era maior para os que tinham sido submetidos a limpeza com uma solução à base de ácido fluorídrico, quando comparados aos que não tinham sido limpos por esta solução [KAWAHARA, 1995]. O aumento de rugosidade que este tratamento ácido provocou sobre a superfície polida do titânio foi considerado pequeno, porém, de resultado significativo nas etapas de proliferação e diferenciação das células.

Segundo KAWAHARA (1995), a utilização de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em meio às soluções à base de ácido fluorídrico, permite a obtenção de superfícies mais

estáveis, através da imediata oxidação dos sítios reativos que ficam expostos sobre a superfície de titânio quando submetido ao ataque do referido ácido.

De acordo com ELLINGSEN (1998), provavelmente, superfícies de titânio modificadas pela presença do fluoretos puderam de algum modo estimular e catalisar a formação de uma matriz extracelular de colágeno mineralizada que permitiu a construção de um novo tecido ósseo ao redor de implantes testados *in vivo*. Os implantes de titânio com uma camada de óxido superficial modificada pela presença de fluoretos apresentaram maior retenção ao novo tecido ósseo que lhe era envolvente após oito semanas da sua inserção em coelhos. Outros autores discutem o papel das interações entre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com o titânio, na possibilidade de formação de peróxidos de titânio sobre a superfície metálica e, muito embora os mecanismos não sejam ainda completamente conhecidos, a presença destes compostos talvez tenha favorecido uma maior osteointegração, com a sua ligação com uma certa proteína ou íon presente na interface biológica *in vivo* [BJURSTEN et al., 1991].

Não foi identificada pela análise de XPS a presença de flúor e / ou de peróxidos de titânio sobre todas as superfícies atacadas com solução à base de ácido fluorídrico e peróxido de hidrogênio (solução F), bem como a presença de radicais OH não ficou claramente definida para quaisquer das superfícies testadas. Além disso, não existem informações sobre os mecanismos de interação dos mesmos com as proteínas que envolvem as células ou que formam a matriz extracelular durante o processo *in vitro* da osteogênese. Para os mecanismos *in vivo* de interação entre estes componentes e as hidroxiapatitas, muito pouco se conhece. Também não foram identificados pelo XPS as presenças de enxofre ou cloro, elementos presentes na solução à base de ácido sulfúrico e ácido clorídrico (solução S). De qualquer forma, embora saiba-se que a modificação química da superfície é um aspecto relevante, praticamente não existe informação na literatura de como essas pequenas modificações podem influenciar a resposta biológica.

Existe dificuldade no isolamento dos efeitos de pequenas modificações químicas que possam ter ocorrido na superfície do titânio das amostras submetidas aos tratamentos ácidos, isto é, para ambas as soluções utilizadas (S ou F), mediante as modificações significativas na microtopografia, principalmente no caso da solução à base de ácido fluorídrico. Assim, os efeitos relacionados a um certo tratamento superficial ficam relacionados à topografia que ele gera.

A contaminação de alumínio, presente nas superfícies J65-0, J65-S, J250-0 e J250-S, aparentemente não provocou efeitos significativos sobre o comportamento das culturas, tal como aconteceu com a microtopografia. Esta conclusão baseia-se na obtenção de abundante matriz extracelular mineralizada para as superfícies J250-S e J250-F.

A fragmentação das partículas de óxido de alumínio, provocada pelo ataque com a solução ácida S, além da suave alteração na micromorfologia da superfície, pode ter favorecido a obtenção de matriz extracelular mineralizada sobre os materiais J65-S e J250-S, ao contrário do observado sobre os materiais J65-0 e J250-0.

CAPÍTULO VI – CONCLUSÃO

Dentro da metodologia, técnicas experimentais e recursos empregados para análise da influência das superfícies testadas sobre a osteogênese em culturas de osteoblastos com origem na medula óssea humana, foi possível obter as seguintes conclusões:

1 – Os tratamentos mecânicos e químicos empregados permitiram a obtenção de superfícies significativamente distintas em suas propriedades químicas, morfológicas e energéticas;

2 – As técnicas de caracterização de superfícies - MEV, XPS, ângulo de contato e de perfilometria (R_a) – associadas a técnicas de caracterização biológica para análise de comportamento *in vitro* na adesão de culturas osteoblásticas, foram efetivas para a obtenção de uma correlação entre a microtopografia do titânio e as etapas do desenvolvimento das culturas desde a adesão celular até à osteogênese (adesão, viabilidade / proliferação, diferenciação e mineralização da matriz extracelular);

3 - Apesar das complicações na obtenção e manutenção de culturas de osteoblastos humanos normais por períodos mais longos, espera-se que os resultados *in vitro*, obtidos para testes com a primeira subcultura, sejam mais representativos na avaliação dos biomateriais testados;

4 - Os efeitos da microtopografia dependem do sistema estudado e do tipo de análise de cada autor, uma vez que, uns consideram que elevados valores de proliferação já mostram bons resultados, já outros, mostram que pequenos valores de proliferação x elevados valores de atividade da fosfatase alcalina é que são considerados bons resultados, mas o objetivo final é a mineralização da matriz extracelular;

5 - Seguindo a linha de raciocínio do item 4, todas as etapas do desenvolvimento das culturas sobre os materiais estudados devem ser analisadas, porém, a etapa que definirá os melhores resultados será a última, a de formação de depósitos minerais de fosfato de cálcio pela atuação dos osteoblastos com uma conseqüente osteogênese. Os aspectos aqui discutidos são de grande importância, uma vez que, existe uma concordância de opiniões que relacionam a necessidade de testes *in vitro* para biomateriais como pré-requisito ou co-requisito para o sucesso de um implante de substituição óssea definitiva.

6 - Analisando todos os resultados em conjunto, as melhores condições de osteogênese foram obtidas para as superfícies jateadas e tratadas com solução à base de ácido fluorídrico (solução F). Estas condições apresentaram um aumento da atividade da fosfatase alcalina e capacidade de formação de matriz extracelular, com a presença abundante de depósitos minerais de fosfato de cálcio para duas famílias com valores distintos de R_a . Este comportamento deve estar relacionado com as características da microtopografia gerada por estes tratamentos e com a obtenção de superfícies homoganeamente rugosas. Estes substratos devem ter providenciado uma superfície mais adequada às reações que ocorrem na interface, condicionadas ao meio de cultura utilizado.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Outras situações podem ser analisadas, ficando como propostas para trabalhos futuros, tais como:

- pré-imersão dos substratos de titânio em meios de cultura, por períodos prolongados, antes da incubação das culturas;
- análise das quantidades e dos tipos de proteínas significativamente adsorvidas sobre os substratos pré-imersos em meios de cultura e que podem estar relacionadas ao processo de adesão celular (fibronectina, albumina) *in vitro*, através da utilização de técnicas como XPS e etc;
- análise da expressão de proteínas da matriz extracelular ao longo dos períodos de incubação das culturas (colágeno do tipo I, fibronectina, osteocalcina);
- obtenção de outros parâmetros de rugosidade, além da rugosidade média (R_a);
- análise tridimensional das microtopografias e cálculo da área superficial efetiva;
- obtenção de valores de ângulo de contato gerados entre as superfícies e α - MEM (Meio Essencial Mínimo; α -MEM - 10,08g/l, água destilada e deionizada e NaHCO_3 - 2,2g/l), contendo nutrientes para alimentação das células e enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de fungizona e 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, tal como o meio de cultura que foi utilizado;
- Obtenção de valores de ângulos de contato gerados entre as superfícies e fluidos com tensões superficiais líquido-vapor bem menores que as da água destilada ou glicerol;
- tratamentos químicos superficiais com outras soluções ácidas / básicas;
- associação de tratamentos térmicos aos tratamentos químicos superficiais;
- análise dos efeitos conjuntos da microtopografia e da adição de hormônios aos meios de cultura.

CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADANSON, A. W., 1990, *Physical Chemistry of Surfaces*, 5 ed., New York, John Wiley & Sons.

ANSELME, K., LINEZ, P., BIGARELLE, M., LE MAGUER, D., LE MAGUER, A., HARDOUIN, P., HILDEBRAND, H. F., IOST, A., LEROY, J.M., 2000a, "The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour", *Biomaterials*, 21, pp.1567-1577.

ANSELME, K., BIGARELLE, M., NOEL, B., DUFRESNE, E., JUDAS, D., IOST, A., HARDOUIN, P., 2000b, "Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses", *Journal of Biomedical Materials Research*, 49, pp. 155-166.

ANSELME, K., 2000, "Osteoblast adhesion on biomaterials", *Biomaterials*, 21, pp. 677-681.

AUBIN, J. E., LIU, F., 1996, In: Bilizikian, J. P., Raisz, L. G., Rodan, G. A. (eds), *Principles of Bone Biology*, New York, Academic Press Inc., p.51.

BAUMEISTER, A., 1978, *Standard Handbook for Mechanical Engineers*, New York, McGraw-Hill.

BELLOWS, C. G., HEERSCH, J. N. M., AUBIN, J. E., 1992, "Inorganic phosphate added exogenously or released from β -glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules *in vitro*", *Bone and Mineralization*, 17, pp.15-29.

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., 1993, "Characterization of cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.303, n.2, pp. 474-482.

BJURSTEN, L. M., TENGVALL, P., 1991, "Modulation of cell activity by titanium prooxy compounds", In: Davies, J. E. (ed), *The Bone-Biomaterial Interface*, proceedings of the Bone-Biomaterial Interface Workshop, Toronto, Ontario, December, 3-4, University of Toronto Press, pp. 165-169.

BLINKINSOP, P. A., 1992, "Advanced Alloys and Processes". In: *Titanium 92 – Science and Technology*, pp. 15-26, Birmingham, UK.

BOYAN, B. D., HUMMERT, T. W., DEAN, D. D., SCHWARTZ, Z., 1996, "Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response", *Biomaterials*, 17, pp. 137-146.

BOYAN, B. D., BATZER, R., KIESWETTER, K., LIU, Y., COCHRAN, D. L., SZMUCKLER-MONCLER, S., DEAN, D. D., SCHWARTZ, Z., 1998, "Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ ", *Journal of Biomedical Materials Research*, 39, pp. 77-85.

BOWERS, K. T., KELLER, J. C., RANDOLPH, A., WICK, D. G., MICHAELS, C. M., 1992, "Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses *in vitro*", *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 7, pp. 302-310.

BRÅNEMARK, P-I, 1983, "Osseointegration and its experimental background", *Journal Prosthetic Dental*, 50, pp. 399-410.

BRUNETTE, D. M., CHEHROUDI, B., 1999, "The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior *in vitro* and *in vivo*", *Journal of Biomechanical Engineering*, 121, pp. 49-57.

CANALE, L. DE C. F., 1996, "Biomateriais – Uso de ligas metálicas", *I Seminário Regional de Biomateriais*, pp. 51-60, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 29-31 de maio.

CASTELLANI, R., DE RUIJTER, J. E., RENGGLI, H., JANSEN, J. A., 1999, "Response of rat bone marrow cells to differently roughened titanium discs", *Clinical Oral Implants Research*, 10, pp. 369-378.

CHOU, L., FIRTH, J. D., UITTO, V-J., BRUNETTE, D. M., 1998, "Effects of titanium substratum and grooved surface topography on metalloproteinase-2 expression in human fibroblasts", *Journal of Biomedical Materials Research*, 39, pp. 437-445.

COELHO, M. J., TRIGO CABRAL, A., FERNANDES, M. H., 2000a, "Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I : osteoblastic of serially passaged human bone marrow cells cultured in α -MEM and in DMEM", *Biomaterials*, 21, pp. 1087-1094.

COELHO, M. J., FERNANDES, M. H., 2000b, "Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation", *Biomaterials*, 21, pp. 1095-1102.

COSTA, M. A., FERNANDES, M. H., 2000, "Long-term effects of parathyroid hormone, 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, and Dexamethasone on the cell growth and functional activity of human osteogenic alveolar bone cell cultures", *Pharmacological Research*, v.42, n.4, pp. 345-353.

CHUNG, C-H., GOLUB, E. E., FORBES, E., TOKUOKA, T., SHAPIRO, I. M., 1992, "Mechanism of action of β -glycerophosphate on bone cell mineralization", *Calcified Tissue International*, 51, pp. 305-311.

DE GROOT, K, 1998, "Calcium phosphate coatings: an alternative to plasma-spray", In: *Bioceramics*, v. 11, *Proceedings of the 11th International Symposium on Ceramics in Medicine*, World Scientific Publishing Co., pp.41-43.

DE SANTIS, D., GUERRIERO, C., NOCINI, P. F., UNGERSBOCK, A., RICHARDS, G., GOTTE, P., ARMATO, U., 1996, "Adult human bone cells from jaw bones cultured on plasma-sprayed or polished surfaces of titanium or hydroxylapatite discs", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 7, pp. 21-28.

DEGASNE, I., BASLÉ, M. F., DEMAIS, V., HURÉ, G., LESOURD, M., GROLLEAU, B., MERCIER, L., CHAPPARD, D., 1999, "Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces", *Calcified Tissue International*, 64, pp. 499-507.

DELIGIANNI, D. D., KATSALA, N., LADAS, S., SOTIROPOULOU, D., AMEDEE, J., MISSIRLIS, Y. F., 2001, "Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti6Al4V on human bone marrow cell response and protein adsorption", *Biomaterials*, v. 22, n. 11, pp. 1241-1251.

DESCOUTS, P., DROZ, E., JOBIN, M., NURDIN, N., TABORELLI, M., 1995, "Surface characterization of biomaterials and imaging of adsorbed biomolecules using scanning probe microscopies", In: *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, Part A, 1, pp. 927-974.

ELIAS, C. N., LIMA, J. H. C., MEIRELLES, L. A., 2000, "Variação da osseointegração com a rugosidade dos implantes odontológicos", *Simpósio Matéria 2000*, Rio de Janeiro, Brasil, 23-27 de outubro.

ELLINGSEN, J.E., 1998, "Surface configurations of dental implants", *Periodontology*, 17, pp. 36-46.

FERNANDES, M. H., COSTA, M. A., CARVALHO, G. S., 1997, "Mineralization in serially passaged human alveolar bone cells", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8, pp.61-65.

FERNANDES, M. H., 1999, "Effect of stainless steel corrosion products on *in vitro* biomineralization", *Journal of Biomaterials Applications*, 14, pp.113-168.

FERRAZ, M. P., FERNANDES, M. H., CABRAL, A. T., SANTOS, J. D., MONTEIRO, F. J., 1999, "*In vitro* growth and differentiation of osteoblast-like human bone marrow cells on glass reinforced hydroxyapatite plasma-sprayed coatings", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 10, pp. 567-576.

FERRAZ, M. P., FERNANDES, M. H., SANTOS, J. D., MONTEIRO, F. J., 2001, "HA and double-layer HA-P₂O₅/CaO glass coatings: influence of chemical composition on human bone marrow cells osteoblastic behavior", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.12, n.7, pp. 629-638.

FRESHNEY, R. I., 1996, *Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique*, 3 ed., USA, John Wiley & Sons.

GRÖßNER-SCHREIBER, B., TUAN, R. S., 1991, "Die bedeutung der oberfläche von titan-implantaten im osteointegrationsvorgang", *Dtsch Zahnärztl Z*, 46, pp. 691-693.

GWYNN, I. A. P., 1994, "Cell biology at interfaces", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5, pp. 357-360.

HANDBOOK OF X-RAY PHOTOELECTRON SPECTROSCOPY, 1979, *Perkin-Elmer Corporation*, USA.

HANCOX, N.M., 1972, *Biology in Bone*, Cambridge Universal Press, London.

JONES, F. H., 2001, "Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials", *Surface Science Reports*, Elsevier, 42, pp. 75-205.

KASEMO, B., LAUSMAA, J., 1991, "The Bone-Biomaterial Interface", In: Davies, J. E., (ed.), pp. 19-32, Toronto.

KAWAHARA, H., 1995, "Biomaterials for Dental Implants", In: Wise, D. L. (ed.), *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, Part B, 2, pp. 1469-1524.

KELLER, J. C., DRAUGHN, R. A., WIGHTMAN, J. P., DOUGHERTY, W. J., MELETIOU, S. D., 1990, "Characterization of sterilized cp titanium Implant surfaces", *International Journal of Maxillofacial Implants*, 5, pp. 360-367.

KELLER, J. C., STANFORD, C. M., WIGHTMAN, J. P., DRAUGHN, R. A., ZAHARIAS, R., 1994, "Characterizations of titanium implant surfaces. III", *Journal of Biomedical Materials Research*, 28, pp. 939-946.

KELLER, J. C., WICK, D. G., DRAUGHN, R. A., WIGHTMAN, J. P., 1995, "The effects of sterilization treatments on adhesion of bone cells to titanium", *Journal Adhesion*, 54, pp. 145-153.

KIESWETTER, K., SCHWARTZ, Z., HUMMERT, T. W., COCHRAN, D. L., SIMPSON, J., DEAN, D. D., BOYAN, B. D., 1996, "Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG63 cells", *Journal of Biomedical Materials Research*, 32, pp. 55-63.

KOWALSKI, J. B., MORRISEY, R. F., 1996, "Sterilization of Implants", In: Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. (eds), *Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine*, chapter 9, pp. 415-420, California, USA, Academic Press.

KURACHI, T., NAGAO, H., NAGURA, H., ENOMOTO, S., 1997, "Effect of a titanium surface on bone marrow-derived osteoblastic cells *in vitro*", *Archives of Oral Biology*, v.42, n.6, pp. 465-468.

LEE, T. M., CHANG, E., YANG, C. Y., 1998, " Surface characteristics of Ti6Al4V alloy: effect of materials, passivation and autoclaving", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 9, pp. 439-448.

LINCKS, J., BOYAN, B. D., BLANCHARD, C. R., LOHMANN, C. H., LIU, Y., COCHRAN, D. L., DEAN. D. D., SCHWARTZ, Z., 1998, "Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition", *Biomaterials*, 19, pp. 2219-2232.

MANIATOPOULOS, C., SODEK, K. Y., MELCHER, A., 1998, "Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats", *Cell Tissue Research*, 143, pp. 213-221.

MARTIN, J. Y., SCHWARTZ, Z., HUMMERT, T. W., SCHRAUB, D. M., SIMPSON, J., LANKFORD, J. JR., DEAN, D. D., COCHRAN, D. L., BOYAN, B. D., 1995, "Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63)", *Journal of Biomedical Materials Research*, 29, pp. 389-401.

MARTIN, T. J., FINDLAY, D. M., HEATH, J. K., NG, K. W., 1993, In: Mundy, J. R., Martin, T. J. (eds), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Berlin, Springer-Verlag, p. 149.

MATSUURA, T., HOSOKAWA, R., OKAMOTO, K., KIMOTO, T., AKAGAWA, Y., 2000, "Diverse mechanisms of osteoblast spreading on hydroxyapatite and titanium", *Biomaterials*, 21, pp. 1121-1127.

MEYLE, J., GÜLTIG, K., NISCH, W., 1995, "Variation in contact guidance by human cells on a microstructured surface", *Journal of Biomedical Materials Research*, 29, pp. 81-88.

MILELLA, E., COSENTINO, F., LICCIULLI, A. , MASSARO, C., 2001, “ Preparation and characterisation of titania / hydroxyapatite composite coatings obtained by sol-gel process”, *Biomaterials*, v. 22, n. 11, pp. 1425-1431.

MOORE, B. K., OSHIDA, 1995, “Materials Science and Technology in Dentistry”, In: Wise, D. L. (ed.), *Enciclopedia Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, part B, 2, pp. 1325-1430.

NISHIGUCHI, S., NAKAMURA, T., KATO, H., FUJITA, H., KIM, H-M., MIYAJI, F., KOKUBO, T., 1998, “Enhancement of bone bonding strengths of titanium alloys by alkali and heat treatments”, In: *Bioceramics*, v. 11, *Proceedings of the 11th International Symposium on Ceramics in Medicine*, World Scientific Publishing Co., pp. 675-678.

OHGUSHI, H., DOHI, Y., YOSHIKAWA, T., TAMAI, S., TABATA, S., OKUNAGA, K., SHIBUYA, T., 1996, “Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on the surface of bioactive glass ceramics”, *Journal of Biomedical Materials Research*, 32, pp. 341-348.

ONG, J. L., PRINCE, C. W., LUCAS, L. C., 1995, “Cellular response to well-characterized calcium phosphate coatings and titanium surfaces *in vitro*”, *Journal of Biomedical Materials Research*, 29, pp. 165-172.

ONG, J. L., CARNES, D. L., CARDENAS, H. L., CAVIN, R., 1997, “Surface roughness of titanium on bone morphogenetic protein-2 treated osteoblast cells *in vitro*”, *Implant Dentistry*, v. 6, n. 1, pp. 19-24.

PRADO DA SILVA, M. H., 1999, *Recobrimento de Titânio com HA: Desenvolvimento do Processo de Deposição Eletrolítica e Caracterização Biológica in vitro*. Tese de D. Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ ,Brasil.

RATNER, B. D., JOHNSTON, A. B., LENK, T. J., 1987, “Biomaterial surfaces”, *Journal of Biomedical Materials Research: Applied Biomaterials*, v.21, n.A1, pp. 59-90.

RATNER, B. D., 1996a, “Surface properties of materials”, In: Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. (eds), *Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine*, chapter 1, pp. 21-35, California, USA, Academic Press.

RATNER, B. D., 1996b, "Correlation of material surface properties with biological responses", In: Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. (eds), *Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine*, chapter 9, pp. 445-450, California, USA, Academic Press.

SÄBERLICH, S., KLEE, D., RICHTER, E.-J., HÖCKER, H., SPIEKERMANN, H., 1999, "Cell culture tests for assessing the tolerance of soft tissue to variously modified titanium surfaces", *Clinical Oral Implants Research*, 10, pp. 379-393.

SALGADO, T., LEGEROS, J. P., WANG, J., 1998, "Effect of alumina and apatitic abrasives on Ti alloy substances", In: *Bioceramics*, v. 11, *Proceedings of the 11th International Symposium on Ceramics in Medicine*, World Scientific Publishing Co., pp. 683-686.

SITTIG, C., TEXTOR, M., SPENCER, N. D., WIELAND, M., VALLOTTON, P.-H., 1999, "Surface characterization of implant materials c.p. Ti, Ti6Al7Nb and Ti6Al4V with different pretreatments", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 10, pp. 35-46.

SLOMKOWSKI, S., KOWALCZYK, D., CHEHIMI, M. M., DEALAMAR, M., 2000, "X-Ray photoelectron spectroscopy as a tool for studies of the surface layer of microspheres. The case of polystyrene and poly(styrene-acrolein) microspheres with attached human serum albumin", *Journal of Colloid and Polymer Science*, Journal n. 396, manuscript n. 0351 B, n. of pages 06.

SMITH, D. C., 1990, "Surface characterization of implant materials: biological implications", In: Davies, J. E. (ed), *The Bone-Biomaterial Interface*, proceedings of the Bone-Biomaterial Interface Workshop, Toronto, Ontario, December, 3-4, University of Toronto Press, pp. 3-17.

STEIN, G. S., LIAN, J. B., STEIN, J. L., 1996, In: Bilizikian, J. P., Raisz, L. G., Rodan, G. A. (eds), "Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation", *Principles of Bone Biology*, chapter 6, New York, Academic Press Inc., pp.69-86.

TABORELLI, M., JOBIN, M., FRANÇOIS, P., VAUDAUX, P., TONETTI, M., SZMUKLER-MONCLER, S., SIMPSON, J. P., DESCOUTS, P., 1997, "Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties

of titanium – (I) Surface Characterization”, *Clinical Oral Implants Research*, 8, pp. 208-216.

TOMÁS, H., CARVALHO, G. S., FERNANDES, M. H., FREIRE, A. P., ABRANTES, L. M., 1997, “The use of rat, rabbit or human bone marrow derived cells cytocompatibility evaluation of metallic elements”, *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, 8, pp. 233-238.

VROUWENVELDER, W. C. A., GROOT, C. G., DE GROOT, K., 1993, “Histological and biochemical evaluation of osteoblasts cultured on bioactive glass, hydroxylapatite, titanium alloy, and stainless steel”, *Journal of Biomedical Materials Research*, 27, pp. 465-475.

WALBOOMERS, X. F., CROES, H. J. E., GINSEL, L. A., JANSEN, J. A., 1999, “Contact guidance of rat fibroblasts on various implant materials”, *Journal of Biomedical Materials Research*, 47, pp. 204-212.

WEN, H. B., LIU, Q., DE WIJN, J. R., DE GROOT, K., CUI, F. Z., 1998, “Preparation of bioactive microporous titanium surface by a new two-step chemical treatment”, *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, 9, pp. 121-128.

WENNERBERG, A., 1996, *On Surface Roughness and Implant Incorporation*. Ph. D. dissertation, Department of Biomaterials / Handicap Research, Institute for Surgical Sciences, Göteborg University, Sweden.

WHITHOUSE, D. J., 1974, “Stylus Techniques”, *Characterization of Solid Surfaces*, pp. 49-74, Plenum Press.

YAN, W. Q., DAVIES, J. E., 1998, “Bone formation around surface modified titanium implants”, In: *Bioceramics*, v. 11, *Proceedings of the 11th International Symposium on Ceramics in Medicine*, World Scientific Publishing Co., pp. 659-662.

ZHITOMIRSKY, I., GAL-OR, L., 1997, “Electrophoretic deposition of hydroxyapatite”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8, pp. 213-219.

APÊNDICE A

METODOLOGIA PARA A FIXAÇÃO E DESIDRATAÇÃO DAS CÉLULAS SOBRE OS MATERIAIS PARA A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As células aderidas sobre os materiais foram fixadas e desidratadas para observação ao MEV por um método que preserva sua morfologia tal como adquirida durante os tempos de incubação *in vitro*. As seguintes etapas descrevem o método utilizado:

- 1 – Remoção do meio de cultura;
- 2 – Lavagem dos materiais com as células aderidas com PBS (“Phosphate-Buffered Saline Solution”) à 37°C;
- 3 – Adição de glutaraldeído 1,5% em cacodilato de sódio 0,14M; solução com pH 7,3 e à 37°C colocada sobre os materiais durante 10 minutos;
- 4 – Remoção da solução de glutaraldeído e posterior lavagem com água destilada e deionizada;
- 5 – Desidratação com a imersão das amostras numa seqüência de álcoois de diferentes graduações:
 - a) Álcool 70° por 10 minutos;
 - b) Álcool 80° por 10 minutos;
 - c) Álcool 90° por 10 minutos;
 - d) Repetir álcool 90° por 10 minutos;
 - e) Colocar amostras em álcool 100°, até o ponto crítico em que serão secas e cobertas com o revestimento fino de ouro.