



CURSO DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA

LUIZ HENRIQUE ALVES MADEIRA

**ESTUDO *IN VITRO* DA INFLUÊNCIA DO PADRÃO DE
RUGOSIDADE DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO SOBRE A
ÁREA DE COÁGULO SANGUÍNEO**

Guarulhos

2014

LUIZ HENRIQUE ALVES MADEIRA

**ESTUDO *IN VITRO* DA INFLUÊNCIA DO PADRÃO DE
RUGOSIDADE DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO SOBRE A
ÁREA DE COÁGULO SANGUÍNEO**

Área de Concentração: Implantodontia
Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Cassoni
Ferreira
Co-Orientador: Prof. Dr. Jamil Awad Shibli

Guarulhos

2014

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca

M181e

Madeira, Luiz Henrique Alves

Estudo in vitro da influência do padrão de rugosidade de superfícies de titânio sobre a área de coágulo sanguíneo / Luiz Henrique Alves
Madeira. -- 2014.

31 f.; 31 cm.

Orientador: Prof^a. Dr. Alessandra Cassoni Ferreira

Tese (Mestrado em Odontologia) – Centro de Pós Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2014.

1. Implantes Dentários 2. Osseointegração 3. Coagulação sanguínea
I. Título II. Ferreira, Alessandra Cassoni, (Orientador). III. Universidade Guarulhos.



CEPPE
Centro de Pós-Graduação e Pesquisa

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada ESTUDO *IN VITRO* DA INFLUÊNCIA DO PADRÃO DE RUGOSIDADE DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO SOBRE A ÁREA DE COÁGULO SANGUÍNEO em sessão pública realizada em 31 de Março de 2014, considerou o candidato LUIZ HENRIQUE ALVES MADEIRA aprovado.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Profa. Dra. Alessandra Cassoni Ferreira (UnG) _____

2. Prof. Dr. Alfredo Mikail Mesquita Melo (UNIP) _____

3. Prof. Dr. Leandro Chambrone (UnG) _____

Guarulhos, 31 de Março de 2014.

Aos meus pais pela educação e eterno incentivo
aos meus estudos, a minha esposa
pelo amor incondicional e
compreensão.

Agradecimentos

Aos meu pais pela educação que me proporcionaram.

À minha amada esposa Paula, pela compreensão com minha ausência e apoio incondicional aos meus sonhos.

À meus filhos Marina e Marcelo, pelo apoio e incentivo para realização de meus objetivos.

À Profa. Dra. Alessandra Cassoni, pela valiosa orientação, atenção e paciência.

Ao Prof. Dr. Jamil Awad Shibli, responsável pela área de implantodontia na UnG, pelas orientações.

Ao Prof. Dr. Alfredo Mikail Mesquita Melo, responsável pelo Centro de Microscopia Eletrônica de Varredura da Universidade Paulista pelo suporte para realização das microscopias.

A Profa. Dra. Gabriela Giro Araújo, pela orientação, incentivo e paciência.

Ao Prof. Carlo Mangano (DDS, MD) e ao Sr. Edoardo Combe (Leader, Novaxa, Milao, Italy) por prover os discos de titânio.

Agradeço a todas as pessoas, que, direta ou indiretamente contribuíram na elaboração desse trabalho.

“ A Razão é o passo, o aumento da ciência o caminho, e o benefício da humanidade é o fim.

(Thomas Hobbes)

RESUMO

O presente estudo avaliou *in vitro* a influência do padrão de rugosidade de superfícies de titânio sinterizado com laser sobre a área de coágulo sanguíneo formado sobre as superfícies. Discos de titânio foram confeccionado com titânio grau 6 (Ti-6Al-4V; Leader Implants, Novaxa, Milão, Itália), com partículas de 25-45 µm como material básico e, o processamento deu-se com um sistema de fibra de laser de Yb (Itérbio) usando um comprimento de onda de 1054 nm com potência contínua de 200W capaz e sinterizar o metal. Foram utilizados 39 discos de 6 mm de diâmetro e 1 mm de altura, divididos em 3 grupos distintos: grupo 1- discos de titânio maquinado polido (n=13); grupo 2- discos de titânio sinterizado sem tratamento de superfície (n=13); e grupo 3- discos de titânio sinterizado com tratamento de superfície realizado com ataque ácido. Quinze discos foram utilizados para as leituras de rugosidade (n=5 de cada grupo). Vinte e quatro discos de titânio foram levados à análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV): dois discos de cada grupo (sem a aplicação de sangue) foram utilizados para a avaliação da superfície e o restante para a análise de extensão do coágulo (n=6 de cada grupo). A avaliação da extensão do coágulo sanguíneo sobre os discos de titânio foi realizada com o auxílio do programa Image J. Para análise estatística, os valores da extensão dos coágulos (pixels²) foram comparados por meio de uma análise estatística não-paramétrica por meio do teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ($p < 0,05$). Os resultados mostraram uma maior extensão do coágulo no grupo 3, quando comparado com os grupos 1 e 2, sendo o grupo 2 intermediário. As imagens de MEV revelaram diferenças marcantes entre as superfícies avaliadas. As superfícies avaliadas do grupo 1 são bem definidas e lisas, enquanto que a superfície dos discos de titânio sinterizado e dos discos de titânio sinterizado com tratamento de superfície realizado com ataque ácido apresentam irregularidades superficiais demonstrando uma textura denteada alternada com projeções evidentes. Os diferentes tratamentos de superfície exercem um papel importante na extensão da formação do coágulo sanguíneo. Além disso, o tratamento de superfície das amostras sinterizadas favorece a extensão do coágulo sanguíneo.

PALAVRAS-CHAVES

implantes dentários, osseointegração; coágulo sanguíneo

ABSTRACT

The present *in vitro* study evaluated the influence of the roughness surface of titanium sintered by laser on the blood clot area. Titanium discs were made from titanium grade 6 (Ti- 6Al -4V; Leader Implants, Novaxa, Milan, Italy), with particles of 25-45 μm as the basic material and the processing was realized with a fiber laser system Yb (ytterbium) using a wavelength of 1054 nm with continuous power of 200W and sintered the metal. It has been selected 39 discs of 6 mm diameter and 1 mm height, divided into three different groups: group 1- titanium disks machined and polished (n= 13); group 2 - sintered titanium disks without surface treatment (n = 13) and group 3- sintered titanium discs with superficial treatment performed with acid. Fifteen discs were used for surface roughness evaluation (n = 5 per group), Twenty-four titanium disks were selected for scanning electron microscopy (SEM) evaluation: two disks of each group (without application of blood) were used for the surface evaluation and the remainder to clot blood extension (n = 6 per group). The assessment of the blood clot extension on titanium discs was performed with the Image J program. For statistical analysis, the values of the extent of clots (pixels²) were compared using a non-parametric statistical analysis Kruskal- Wallis test and Dunn tests ($p < 0.05$). The results showed a higher extension of blood clot in group 3 compared to group 1 and 2 with intermediate values for group 2. The SEM images showed differences between the surfaces evaluated. The surfaces of the group 1 are well defined and smooth, whereas the surface of the titanium sintered discs and the discs sintered titanium with surface treatment performed with etching surface showed irregularities and projections. The different surface treatments, played an important role in the blood clot extension. In addition, the surface treatment of sintered samples favors the blood clot extension.

KEYWORDS

dental implants, osseointegration; blood clot

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	10
2. PROPOSIÇÃO	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÕES	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os implantes de titânio indicados para pacientes parcial ou totalmente desdentados tem altos índices de sucesso para sua total reabilitação (Albrektsson et al., 1986; Smith et al., 1989; Buser et al., 1997; Al-Nawas et al., 2012). Diversos estudos mostram a influência das características da superfície de implantes de titânio como um fator relevante para o sucesso da osseointegração (Ivanoff et al., 2003; Kim et al., 2003; Shibli et al., 2007). Em contraste com superfícies usinadas e lisas inicialmente empregadas, as superfícies micro ou nano estruturadas mostram um aumento da interface osso-implante (BIC) favorecendo a osseointegração (D'ávila et al., 2010).

Quando instala-se implante, o primeiro tecido que entra em contato com o implante é o sangue, que irá desencadear a formação do coágulo e este sofrerá várias alterações biológicas para formar o tecido ósseo ao redor do implante instalado cirurgicamente.

1.1 Coágulo e inflamação

A coagulação sanguínea inicia-se com a formação de uma camada de fibrina (D'hoedt et al., 1985, Meyer et al., 1988, Wen et al., 1996; Davies, 1998; Zechner et al., 2003), seguindo uma série de eventos biológicos que podem ser influenciados pelas características da superfície dos implantes.

A cicatrização de ferimentos de tecidos moles na cavidade oral ocorre da mesma forma que a cicatrização de outras áreas do corpo. Após a realização da osteotomia, inicia-se a formação de coágulo nas proximidades das roscas de implantes instalados que inicialmente selará o ferimento. O coágulo é infiltrado por células inflamatórias, como os neutrófilos e macrófagos. A coagulação é o primeiro passo para cicatrização do tecido ósseo, sendo o fibrinogênio o precursor sanguíneo solúvel do coágulo (Smith et al. 2000). A fibrina é formada no ato da injúria promovendo uma matriz temporária para suportar a resposta celular endotelial (Kawase et al., 2003). Então o plasma em contato com a superfície do implante, inicia a cascata de coagulação, que se inicia com a formação da rede de fibrina e ativação do sistema complemento.

Dentre as células inflamatórias, os macrófagos são considerados as células especializadas em reparar ferimentos e as populações de macrófagos no ferimento mudam com o decorrer tempo de acordo com recentes evidências que sugerem que, células com diferentes fenótipos orientam as diferentes fases de cicatrização (Brancato; Albina, 2011). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento transformador β -1 (TGF β -1) podem ser citados como as citocinas e outros fatores regulatórios liberados pelos macrófagos (Oakley; Larjava, 2012; Turabelidze; Di Pietro, 2012; Fredman; Serhan, 2012).

Além disso, o coágulo de fibrina-fibronectina fornece uma matriz provisória utilizadas pelos fibroblastos e células epiteliais para migrar para o espaço da ferida cirúrgica. Dessa forma, as células progenitoras de fibroblastos invadem a matriz provisória e depositam tecido de granulação que se torna vascularizado pela migração de células endoteliais (Villar et al., 2012).

1.2 Osseointegração e microestruturas

Estudos clínicos apresentam dados de implantes osseointegrados que apresentam superfícies tratadas ou texturizadas, e que são capazes de receber carga mastigatória em um período menor (Lekholm, 2003; D'Avila et al., 2010). Estudos histológicos (Trisi et al., 2003; Ivanoff et al., 2003) também apontam esse fato. Esses estudos clínicos e laboratoriais determinaram o percentual de osseointegração, isto é, a relação entre o contato do tecido ósseo (COI) e a superfície do implante, que tem por objetivo otimizar a microestrutura dos implantes.

O percentual de osseointegração depende de vários aspectos: tipo de microestrutura, condições sistêmicas do indivíduo, técnica cirúrgica, disponibilidade e qualidade do tecido ósseo (Grassi et al., 2007; D'Avila et al., 2010).

Estudos relacionando taxa de contato osso/implante demonstraram que implantes dentais osseointegráveis de superfícies lisas, colocados em osso tipo IV (região posterior da maxila e áreas enxertadas) apresentam altos índices de perda comparados a outras áreas de melhor densidade óssea (Jaffin et al., 1991; D'Avila et al., 2010). A texturização ou modificação superficial dos implantes pode facilitar a cicatrização e o aumento da porcentagem do COI% em áreas de tecido ósseo pobre

(Matsuo et al., 1999; Grassi et al., 2007; Iezzi et al., 2013; Mangano et al., 2014). A partir desses dados, vários estudos têm investigado diferentes superfícies de implante, obtidas por meio de técnicas de adição (recobertas com plasma de titânio, hidroxiapatita) ou subtração (jateamento com diferentes tipos de materiais como óxido de titânio ou alumínio, tratadas com ácidos, e preparadas com laser) (Kim et al., 2003). As qualidades biológicas do implante dental dependem das propriedades químicas, físicas, mecânicas e topográficas da superfície - essas diferentes propriedades interagem entre si, influenciando a atividade celular ao redor da superfície de implante (Mangano et al., 2014)

A superfície jateada e tratada por meio de ácidos é obtida por meio do jateamento, durante um período de tempo determinado e, sob pressão controlada, dos implantes de titânio comercialmente puro (TiCp), com um jato de ar e material abrasivo (óxido de alumínio ou óxido de titânio). Esta superfície é modificada obtida após a imersão em banho ácido sob diferentes temperaturas e períodos de tempos, a fim de remover resíduos e alguns contaminantes da superfície previamente jateada. As propriedades da superfície influenciam as células ósseas que migram e proliferam da loja cirúrgica do implante durante a inserção, atingindo melhores taxas de contato osso-implante, devido à área de contato da superfície aumentada (Kim et al., 2003; Grassi et al., 2007; Iezzi et al., 2013; Mangano et al., 2014). Em adição, essa rugosidade superficial fornece uma configuração que favorece a retenção do coágulo sanguíneo, estimula e facilita o processo de osseointegração e permite que estes implantes possam ser submetidos à carga protética após um tempo de reparo menor (Trisi et al., 2003).

As características das superfícies do titânio podem influenciar a adsorção de proteínas, as funções celulares e a formação de tecidos. Superfícies com nano estruturas afetam eventos osteogênicos precoces, as propriedades físicas, químicas, mecânicas e a topografia dos implantes influenciam a atividade celular ao redor do implante (Matsuo et al., 1999; Protivinsky et al., 2007; Schweikl et al., 2007).

A rugosidade influencia o espalhamento celular, a proliferação, produção de fosfatase alcalina, colágeno, proteoglicanas e osteocalcina, síntese de citocinas e fatores de crescimento e a capacidade das células em responder aos sinalizadores moleculares. Moderadamente, as superfícies dos implantes rugosas promovem diferenciação das células osteoblásticas que alcançam integração óssea rápida e forte. De acordo com o aumento da rugosidade superficial, ocorre a diminuição da

proliferação celular e, a diferenciação celular é conduzida em direção a um fenótipo osteoblástico, em que as células segregam fosfatase alcalina, osteocalcina e fatores de crescimento β transformador (Iezzi et al., 2013).

O titânio é um material com alta resistência mecânica e baixa densidade, com excelente resistência a corrosão, devido a esta propriedade principalmente ele vem sendo utilizado em medicina (confecção de próteses) e em odontologia (implantes osseointegrados e em cirurgia buco-maxilo-facial). O titânio é considerado um material bioinerte, isto é, não induz resposta imunológica. Contudo, vários autores (Kim et al. 1996; Kitsugi et al., 1996) tem demonstrado que modificações de superfície alteram a bioatividade do titânio.

Kawahara e Takano (1995) definiram os três principais métodos de modificação de superfície dos implantes: modificação por tratamento mecânico, por aplicação de recobrimentos e/ou por tratamentos químicos.

O tratamento mecânico, que pode ser por usinagem, aumentando a rugosidade, reentrâncias, furos para que o osso possa ser formado por entre esses entalhes, ou por jateamento, aumentando a rugosidade das superfícies com jatos de óxido de alumínio, óxido de silício e óxido de titânio. Após o jateamento recomenda-se um tratamento com ácido para uniformizar as rugosidades e retirar partículas de óxido incrustadas.

Aplicação de recobrimentos, geralmente recobertos com material bioativo, principalmente hidroxiapatita. O objetivo deste processo é a eliminação de contaminações de superfície e produção de uma superfície rugosa e porosa.

Tratamentos químicos, com ácidos, anodização ou implantação iônica; tem como objetivos principais, limpeza da superfície, criação de rugosidades e ativação da superfície através da alteração estrutural da camada de óxido.

Gretzer et al., em 2003, estudaram a influência de diferentes propriedades dos materiais sobre os parâmetros da resposta inflamatória e sobre adesão celular a materiais com propriedades químicas muito diferentes, mas com topografia de superfície semelhantes. Zechner et al. (2003) mostraram que a topografia da superfície do implante pode afetar não somente a expressão gênica de osteoblastos, mas também o processo de diferenciação das células em osteoblastos, o que irá aumentar a formação de uma matriz óssea em contato com a superfície dos implantes. Refai et al. (2004) mostraram que a inserção celular e proliferação destas dependem tanto da rugosidade e morfologia das superfícies dos implantes como da

composição química das mesmas. Protvinsky et al. (2007) também observaram em seu estudo resultado semelhante, onde superfícies igualmente rugosas, mas que receberam diferentes tratamentos, mostraram diferentes desempenhos quanto a inserção celular.

Di Iorio et al. (2005) avaliaram *in vitro* a extensão do coágulo de fibrina em diferentes superfícies de implante. Neste trabalho avaliaram três tipos de superfície: (1) superfície lisa, (2) superfície jateada com óxido de alumínio e ataque ácido, (3) superfície jateada com óxido de alumínio mas com ataque ácido em alta temperatura controlado por computador. A análise quantitativa da extensão do coágulo de fibrina observou-se que a superfície lisa apresentou menor extensão que a jateada com óxido de alumínio e ataque ácido e esta menos que a superfície jateada com óxido de alumínio e ataque ácido em alta temperatura. Após colocar sangue sobre as amostras de cada grupo, observou-se ao microscópio eletrônico de varredura que a superfície 3 apresentou sulcos em 2 níveis diferentes com formas diferentes o que levou à uma maior adesão do coágulo. Concluindo que quanto maior a microtextura da superfície maior a extensão do coágulo.

Ota-Tsuzuki et al. (2011) também avaliaram a influência de tratamentos de superfície sobre a extensão do coágulo formado. Avaliaram três tipos de superfície: (1) superfícies maquinadas (grupo controle); (2) superfície jateada com óxido de alumínio e lavadas com solução de ácido nítrico; (3) superfície jateada com dióxido de titânio e lavadas com solução de ácido maleico.

Foi colocado sangue de um doador saudável não fumante sobre as amostras dos diferentes tipos de superfície, sangue que foi incubado por 20 minutos a temperatura ambiente lavado varias vezes em PBS, fixado em formol a 1% em PBS por 15 minutos e desidratado em solução alcoólica em diversas concentrações ,após a desidratação as amostras ficaram à temperatura ambiente por 3 dias para secagem, sendo levadas para microscópio eletrônico de varredura, para análise da extensão do coágulo. Microscópio eletrônico de varredura revelou elementos do sangue como hemácias, fibrina e plaquetas.

Park et al. (2001) mostraram que o coágulo inserido na superfície do implante, apresenta células do tecido conjuntivo que migram e promovem modificações por meio de mecanismos de troca de íons e proteínas, da mesma maneira que atividades celulares sanguíneas, componentes celulares e humoral do sangue, que interagem com o implante após células osteogênicas invadirem o local da ferida

cirúrgica e interação melhor quando a superfície do implante possui óxido de titânio.

O mecanismo da coagulação ocorre em 3 etapas: (1) como resposta ao trauma ocorre uma cascata de reações químicas no sangue, que resulta na formação de complexos de substâncias ativadas, denominadas ativadores de protrombina; (2) o ativador de protrombina catalisa a conversão de protrombina em trombina; (3) a trombina age como uma enzima que converte o fibrinogênio em fibras de fibrina, e estas envolvem as plaquetas, os glóbulos sanguíneos e o plasma para formar o coágulo (Park et al., 2001). Além disso, o PDGF e outras proteínas alfa-grânulos, por exemplo, TGF-beta, são conhecidos por serem potentes promotores de osteogênese, sugerindo que as pronunciadas propriedades trombogênicas do titânio podem contribuir para boa osseointegração (Hong et al., 1999).

Moura et al. (2013) avaliaram o efeito de um revestimento cerâmico bioativo com espessura nanométrica em titânio em células humanas osteogênicas, células mononucleares do sangue periférico e em células osteogênicas co-cultivadas com células mononucleares do sangue periférico sem estímulos exógenos. Foi avaliado a viabilidade celular, proliferação, adesão e liberação de citocinas (IL 1 beta, TGF-beta 1, IL10 e IL17) e mancha intracelular para osteopontina e fosfatase alcalina.

O osso para cultura de células foi obtido do queixo de seres humanos saudáveis através de trefina com irrigação contínua de soro fisiológico, este osso foi dividido em fragmentos pequenos e a cultura e co-cultura das células foram feitas. Quando a cultura e co-cultura estavam prontas os mesmos doadores foram chamados para coleta do sangue. Os resultados mostraram que a viabilidade celular à 24 horas não apresentou diferenças significativas nos níveis de absorção de células osteogênicas e mononucleares cultivadas nas três diferentes superfícies, adesão celular também não revelou diferenças significativas à 24 horas para as três superfícies, no entanto adesão de células osteogênicas cultivadas foi maior em superfícies rugosas em comparação com a superfície controle. Na cultura de células mononucleares do sangue periférico os níveis de TGF-beta1 e IL17 liberados não foi diferente nas primeiras 24 horas entre as três superfícies, no grupo 3 os níveis de IL10 foram significativamente menores do que os grupos 1 e 2, os níveis de IL 1 beta foi significativamente maior no grupo 1 em comparação com os grupos 2 e 3.

Na cultura de células osteoblásticas, as características de superfície influenciaram a liberação de TGF-beta1, IL 1 beta e IL 17 mas não influenciaram os

níveis de IL 10. Os níveis de IL 1 beta produzidos à 7 dias foram significativamente maiores para os grupos 1 e 2 em relação ao grupo 3, aos 14 dias as células cultivadas sobre o grupo 1. Produziram níveis significativamente maiores em comparação com os grupos 2 e 3. Os níveis de IL 17 a 24 horas foi significativamente maior para os grupos 1 e 2 comparados com o grupo 3, aos 7 dias o grupo 3 apresentou valores significativamente maiores que os grupos 1 e 2. Co cultura de células mononucleares do sangue periférico e células osteogênicas sobre o grupo 3 à 24 horas mostraram níveis de IL 10 menores que os grupos 1 e 2, no dia 7 níveis de IL 10 nos grupos 1 e 3 foram maiores que grupo 2. Níveis de TGF beta 1 a 24 horas e 7 dias sobre grupo 1 e 3 foram maiores que o grupo 2, aos 14 dias grupo 1 obteve níveis maiores que grupo 2 e 3. Os níveis de IL 1 beta não apresentaram diferenças significantes entre as superfícies em todos os períodos avaliados.

A sinterização de metais formados a laser, é um procedimento no qual um feixe de laser de alta potência é direcionado ao pó e programado para fundir partículas de acordo com um arquivo de desenho assistido por computador, gerando uma camada fina de metal. Com essa técnica de sinterização, é possível fabricar implantes dentários com uma superfície porosa (Mangano et al., 2014). As superfícies de titânio sinterizadas por laser seguidas de aplicação de solução ácida foram descritas como irregulares e com crateras arredondadas de variadas formas e tamanhos, mostrando uma ampla área para o embricamento com o tecido ósseo conforme descrito previamente por Mangano et al. (2009). Foi reportado uma extensão do coágulo humano levemente melhorado pelo condicionamento com ácido inorgânico para aumentar a microrrugosidade (Mangano et al., 2009). Além disso, os tecidos perimplantares ao redor de implantes sinterizados à laser apresentam as fibras de colágeno, em forma de feixes, que ficam orientadas perpendicularmente a uma distância de 100 μm a partir da superfície, onde se tornam paralelas, se dirigindo a várias direções (Mangano et al., 2014). Mangano et al., (2014) afirmaram que, ao alterar a microtextura superfície, foi possível alterar a resposta dos tecidos moles peri-implantares. Implantes sinterizados a laser apresentam uma taxa de contato osso-implante de 45,2% em carga imediata comparado com os implantes que não sofreram carga (34,10%) (Shibli et al., 2013)

O propósito deste estudo foi comparar a área de coágulo sanguíneo formado sobre as superfícies de titânio com diferentes rugosidades.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo *in vitro* foi avaliar a influência do padrão de rugosidade de superfícies de titânio sobre a área de coágulo sanguíneo formado sobre as superfícies por microscopia eletrônica de varredura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizados 39 discos de 6 mm de diâmetro e 1 mm de altura, divididos em 3 grupos distintos: **Grupo 1**: discos de titânio maquinado polido, sem tratamento superficial, usado como controle (n=13); **Grupo 2**: discos de titânio sinterizado (n=13); e **Grupo 3**: discos de titânio sinterizado com tratamento de superfície realizado com ataque ácido de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais

Grupos		n= amostras
Grupo 1	Titânio maquinado polido	13
Grupo 2	Titânio sinterizado com laser	13
Grupo 3	Titânio sinterizado com laser seguido por condicionamento ácido	13

Os discos de titânio do grupo 1 foram confeccionado com titânio grau 6 (Ti-6Al-4V; Leader Implants, Novaxa, Milão, Itália). Os discos de titânio do grupo 2 foram confeccionado com titânio grau 6 (Ti-6Al-4V; Leaders Implants, Novaxa, Milão, Itália), com partículas de 25-45 µm como material básico. O processamento deu-se com um sistema de fibra de laser de Yb (Itérbio) (EOS GmbH Munchen, Alemanha) usando um comprimento de onda de 1054 nm com potência contínua de 200W e razão de escaneamento de 7 m/s. O tamanho do spot do laser era de 0,1 mm. Os discos de titânio do grupo 3 passaram pelo mesmo processamento descrito no grupo 2 e, para remover as partículas do processamento, as amostras receberam banho de água destilada por 5 min em ultrassom à 258 °C, imersas em NaOH (20 g/L) e peróxido de hidrogênio (20 g/L) à 80 °C por 30 min, e então imersas em ultrassom por 5 min em água destilada. O condicionamento ácido foi realizado pela imersão das amostras em uma mistura de 50% de ácido oxálico e 50% de ácido maléico à 80°C por 45 min, lavadas por 5 min em uma cuba ultrassônica com água destilada.

Avaliação da extensão do coágulo sanguíneo

Dezoito discos (n=6 por grupo) foram distribuídos em uma placa de 96 poços. Em cada poço foi colocado um disco. Em seguida, foi realizado a coleta de 10ml de sangue venoso tomada no antebraço um doador saudável, do sexo masculino, não fumante. Para a coleta foram selecionados tubos de 10 ml (BD Vacutainer Serum, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) sem anticoagulantes, trombina bovina, ou qualquer outro agente por meio de *scalpe* para coleta de sangue à vácuo (21Gx3/4x7, BD Franklin Lakes, NJ, USA). Logo após, 100 µl do sangue coletado foi adicionado sobre os discos utilizados no estudo, com o uso de uma pipeta. Os discos contendo o sangue em sua superfície foram, então, incubado por 20 minutos, em temperatura ambiente. Após incubação, os discos foram então lavados com solução tampão de fosfato (PBS), por 3 vezes, durante 5 minutos. Após lavagem as amostras foram fixadas em formaldeído 1% por 15 minutos. Após fixação, as amostras foram submetidas a mais 3 ciclos de lavagem, como descrito anteriormente. Seguindo o processo de fixação, as amostras foram incubadas por 10 minutos em PBS contendo 0,02 M de glicina, e submetidas aos ciclos de lavagem. Em seguida as amostras foram, então, desidratadas em soluções de álcool nas concentrações de 25%, 50%, 75%, 95% e 100%, pelo período de 10 minutos, em cada solução e foi então realizada a secagem das amostras por 72 horas para posterior realização do ensaio em microscopia eletrônico de varredura.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Vinte e quatro discos de titânio foram levados à análise de microscopia eletrônica de varredura. Dois discos de cada grupo (sem a aplicação de sangue) foram utilizados para a avaliação da superfície (n=2). O restante das amostras (n=6 de cada grupo) foi pulverizado e revestido com ouro para a avaliação com o microscópio eletrônico de varredura (JSM-6610/6510 Series; JEOL, Tóquio, Japão). As superfícies foram escaneadas e as áreas mais representativas foram fotografadas em 15, 500 e 1500x de magnificação.

As microfotografias digitalizadas foram analisadas pelo programa Image J (1.40/java 1.6.0_07 software - Wayne Rasband National Institutes of Health, EUA <http://rsb.info.nih.gov/ij>) para a avaliação da extensão de coágulo formada sobre as superfícies de titânio.

As regiões do coágulo de sangue humano foram delimitadas usando *backscattering*. As imagens foram calibradas usando o pixel como unidade, e depois disso foram delimitadas permitindo que extensão do coágulo na superfície da amostra fosse determinada. O software automaticamente soma as áreas (pixels²). Um examinador cego realizou duas vezes as análises.

Análise estatística

Os valores da extensão dos coágulos (pixels²) foram comparados por meio de uma análise estatística não-paramétrica comparando os grupos por meio do teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) seguido do teste de Dunn. Para a avaliação das diferenças estatísticas foi utilizado o software SPSS (IBM).

4. RESULTADOS

Avaliação da extensão do coágulo sanguíneo

A distribuição da extensão do coágulo sanguíneo aderido às superfícies de titânio está apresentada na Figura 1.

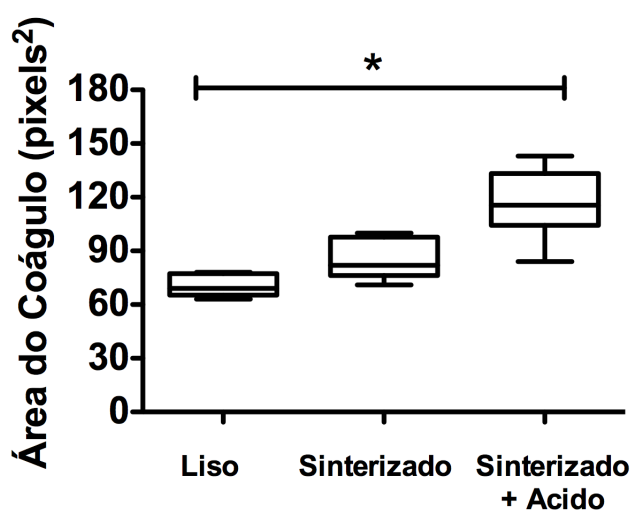


Figura 1. Box-plot da extensão total do coágulo (pixels²) das superfícies avaliadas. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$)

Os resultados da análise estatística mostraram uma maior extensão do coágulo no grupo 3, quando comparado com os grupos 1 e 2, sendo o grupo 2 intermediário.

Microscopia eletrônica de varredura

As imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura revelaram diferenças marcantes entre as superfícies avaliadas. Em adição, a superfícies avaliadas (grupo 1), titânio maquinado polido é bem definida e lisa (Figura 2A), enquanto a superfície dos discos de titânio sinterizado e dos discos de titânio sinterizado com tratamento de superfície realizado com ataque ácido apresentam irregularidades superficiais (Figura 2B e 2C). As imagens obtidas com

500x de magnificação demonstram uma textura denteada alternadas com projeções evidentes (Figura 2B e 2C).

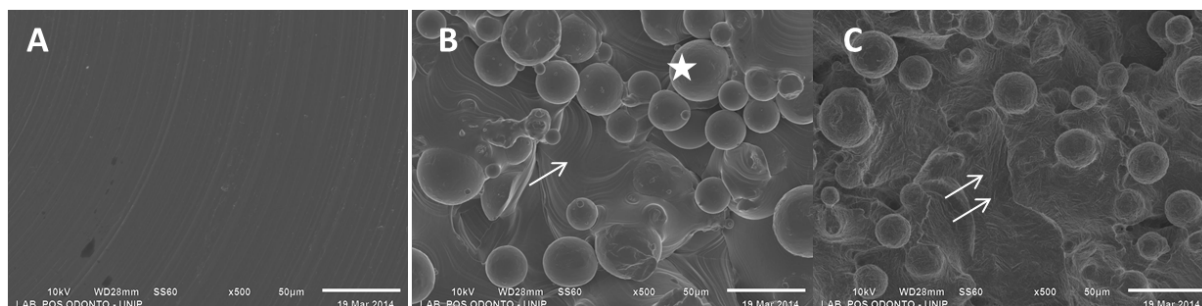


Figura 2. Imagens representativas da microscopia eletrônica de varredura (grupos controle) do grupo 1, titânio maquinado polido **(A)**; grupo 2, titânio sinterizado com laser e **(B)** grupo 3, titânio sinterizado com laser e condicionado com ácido **(C)** Em **(B)** e **(C)** observam-se projeções com picos e vales provenientes do processo de sinterização (estrela); em **(B)** a superfície sinterizada apresenta-se mais lisa (flecha) do que em **(C)** que apresenta a superfície que sofreu o tratamento pós sinterização, mais rugosa (dupla flecha) (500X) (Barra: 50 μ m)

As imagens de MEV revelaram diferentes extensões de área recoberta por coágulo sanguíneo de acordo com a superfície avaliada. Nas superfícies relativas ao grupo 1 (titânio maquinado polido) pequena extensão de recobrimento foi observada (Figura 3A), enquanto que a superfície dos discos de titânio sinterizado apresentaram uma maior área recorta pelo coágulo sanguíneo (Figura 3B). Sobre os discos de titânio sinterizados com tratamento de superfície realizado com ataque ácido observou-se a maior área de recobrimento (Figura 3C). As Figuras 3A, 3B e 3C apresentam imagens representativas dos grupos avaliados com 15x de magnificação.

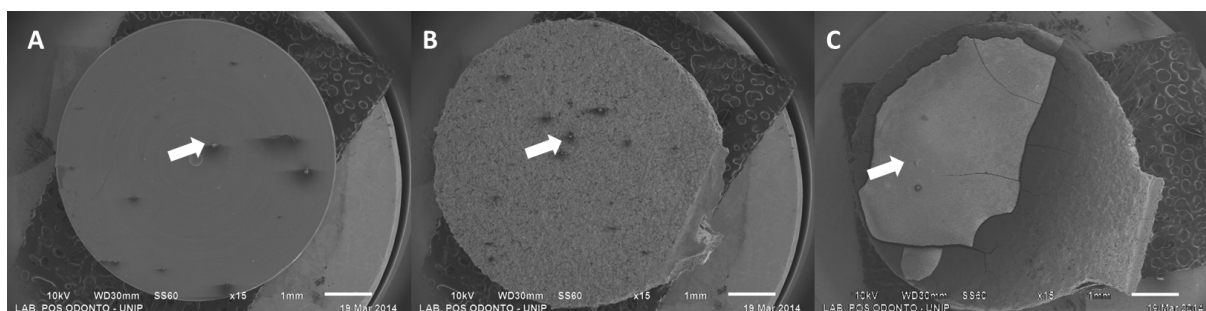


Figura 3. Imagens representativas da microscopia eletrônica de varredura (grupos coágulo) do grupo 1, titânio maquinado polido **(A)**; grupo 2, titânio sinterizado com laser e **(B)** grupo 3, titânio sinterizado com laser e condicionado com ácido **(C)** o

coágulo pode ser observado em diferentes proporções nos grupos avaliados (flecha) (15 X) (Barra: 1 mm)

As imagens de MEV (Figuras 4A-C) revelaram a presença do coágulo sanguíneo de acordo com a superfície avaliada. Nas superfícies relativas ao grupo 1 (titânio maquinado polido) observa-se um pequeno coágulo retraído (Figura 4A), enquanto que na superfície do grupo 2 (disco de titânio sinterizado) observa-se uma coágulo sanguíneo de dimensão maior (Figura 4B). Sobre os discos de titânio sinterizados com tratamento de superfície realizado com ataque ácido (grupo 3) observou-se uma extensa área recoberta por células sanguíneas e rede de fibrina, assim como elementos do sangue como hemácias foram observados sobre todas as amostras. As Figuras 4A, 4B e 4C apresentam imagens representativas dos grupos avaliados com 1500x de magnificação.

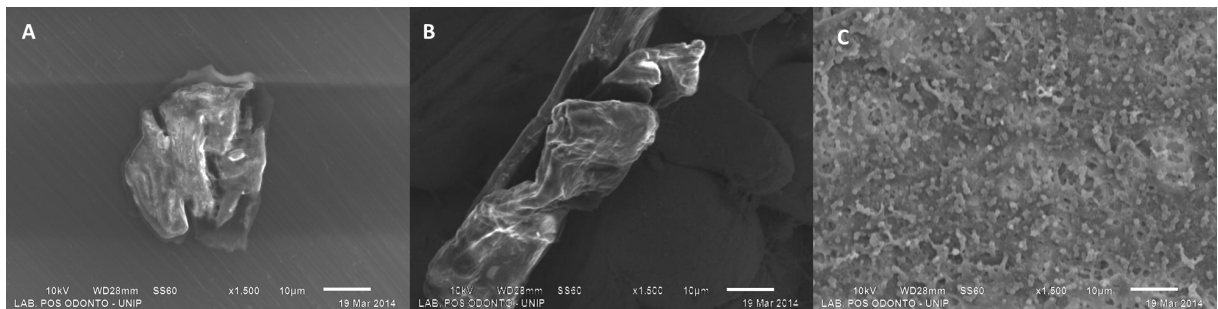


Figura 4. Imagens representativas da microscopia eletrônica de varredura das amostras que receberam o coágulo sanguíneo: titânio maquinado polido (**A**); titânio sinterizado com laser e (**B**) titânio sinterizado com laser e condicionado com ácido (**C**) o coágulo pode ser observado de acordo com os grupos (1500 X) (Barra: 10 µm)

5. DISCUSSÃO

O objetivo das pesquisas atuais com implantes de titânio é criar uma superfície com propriedades que acelerem a ósseo integração e que também aumente a adesão celular (Gretzer et al., 2003; Zechner et al., 2003; Refai et al., 2004; Mangano et al., 2009; Moura et al., 2013). Os diferentes tipos de tratamento de superfície dos implantes podem oferecer uma melhor estabilização do coágulo melhorando a formação óssea sobre a superfície dos implantes (Shibli et al., 2003). Grassi et al. (2007), em estudo *in vivo*, compararam por meio de análise histológica, duas superfícies distintas, uma lisa e outra jateada com dióxido de titânio e ataque ácido. Os resultados demonstraram que uma neoformação óssea e uma possível osteogênese em contato direto com as superfícies tratadas ocorria. Os autores sugeriram que implantes de superfície rugosa podem aumentar o processo de ósseo integração.

O contato do sangue com as proteínas e, no presente estudo, com diferentes topografias de superfície do implante, conduz à iniciação de uma cascata de coagulação através das vias intrínsecas e extrínsecas, resultando na coagulação do sangue na superfície do implante (Datte et al. 2009; Ota-Tsuzuki et al., 2011). Sabe-se que a coagulação é o primeiro passo na cicatrização do tecido ósseo, formando primeiramente uma rede de fibrina e formando uma matriz temporária para suportar a resposta celular endotelial (Park et al., 2001). Diferenças na rugosidade de superfície influenciam na quantidade de proteínas adsorvidas. A rugosidade superficial tem um papel importante na influência da atividade celular (Iezzi et al., 2013).

Imediatamente após a colocação do implante, as proteínas do plasma são adsorvidas sobre a superfície do implante e uma rede de fibrina é formada e irá servir como um andaime para as células do sangue, incluindo as plaquetas e células mononucleares e polimorfonucleares. Assim, essas células são provavelmente uma das células iniciais para migrar e para localizar na proximidade ou em contato com a superfície do implante, e são conhecidos como sendo um fator influente para as respostas osteogênicas subsequentes. Portanto, é possível que o contato inicial e a interação entre as células do sangue e a superfície do implante irá provavelmente resultar numa cascata de eventos que irão determinar a taxa e a qualidade do processo de cura do osso (Park et al., 2001).

As superfícies de titânio sinterizadas por laser, seguidas de aplicação de solução ácida (grupo 3), apresentaram-se mais irregulares e com picos e vales de variadas formas e tamanhos, mostrando uma ampla área para o embricamento com o tecido ósseo conforme descrito previamente por Mangano et al. (2009). As amostras do grupo 3 apresentaram a maior extensão de coágulo sanguíneo (Figura 1). Esse fato pode ser devido à diferença de molhabilidade entre as superfícies. Espécimes com maior rugosidade (grupo 3) obtiveram a molhabilidade mais eficiente (Datte et al. 2009; Ota-Tsuzuki et al., 2011).

Foi reportado uma extensão do coágulo humano levemente melhorado pelo condicionamento com ácido inorgânico para aumentar a microrrugosidade (Mangano et al., 2009) esse fato também foi observado no presente estudo pois uma maior área de coágulo foi observada nos discos que receberam tratamento de superfície (grupo 3). Para as amostras sinterizadas por laser (grupo 2) observou-se uma menor extensão de coágulo (Figura 1). Além disso, implantes sinterizados por laser seguidos de aplicação de solução ácida apresentam uma porcentagem maior de contato osso implante após a aplicação da carga imediata comparados aos implantes que não foram submetidos à carga imediata (Shibli et al., 2013).

Os tecidos moles peri-implantares observados sob microscopia eletrônica de varredura apresentam um íntimo contato da matriz fibrosa com a superfície do implante e, alguns feixes de colágeno poderiam ser visto diretamente a superfície do metal (Mangano et al., 2014).

Refai et al. (2004) mostraram em seu trabalho *in vitro* que topografia de superfície sobre as quais macrófagos foram cultivados com e sem estímulo de lipopolissacarídeos, modulam a produção de citocinas e quimiocinas de maneira dependente do tempo.

Park e Davies (2000) também observaram uma maior aglomeração de elementos sanguíneos sobre a superfície com microrrugosidades comparadas à superfície polida, que também foi responsável pelo aumento da agregação plaquetária, de acordo com os achados do presente trabalho.

6. CONCLUSÕES

Dentro das limitações do presente estudo, os dados coletados sugerem que as diferentes superfícies de titânio, exercem um papel importante na extensão da formação do coágulo sanguíneo. O tratamento da superfície sinterizada ácido tratada favorece de forma significativa a extensão do coágulo sanguíneo formado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Nawas B, Kämmerer PW, Morbach T, Ladwein C, Wegener J, Wagner W. Ten-Year Retrospective Follow-Up Study of the TiOblast™ Dental Implant. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012 Mar;14(1):127-134.

Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson A. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1986; 1: 11–25.

Brancato SK, Albina JE. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, Buser D, Mericske-Stern R, Bernard JP, Behneke A, Behneke N, Hirt HP, Belser UC, Lang NP. Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clin Oral Implants Res*. 1997 Jun;8(3):161-72.

D'Avila S, dos Reis LD, Piattelli A, Aguiar KC, de Faveri M, Borges FL, Iezzi G, Oliveira NT, de G Cardoso LA, Shibli JA. Impact of smoking on human bone apposition at different dental implant surfaces: a histologic study in type IV bone. *J Oral Implantol*. 2010;36(2):85-90

D'Hoedt B. The influence of implant materials and material surfaces on blood clotting: A scanning electron microscopy study. In: van Steenberghe D, Albrektsson T, Branemark PI, Henry PJ, Holt R, Linden C, editors. *Tissue Integration in Oral and Maxillofacial Reconstruction. Proceedings of an International Congress. Current Clinical Practice Series, Vol. 29, Madison, WI. Chicago, IL: Quintessence Publishing Co., Ltd, 1985. p 46–50*

Datte, Carlos Eduardo. **Impacto da topografia de implantes de titânio sobre a extensão do coágulo sanguíneo**. 2009. 44 f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Guarulhos, Guarulhos, 2009

Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*.1998;11:391–401

Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ*. 2003 Aug;67(8):932-49. Review.

Di Iorio D, Traini T, Degidi M, Caputi S, Neugebauer J, Piattelli A. Quantitative evaluation of the fibrin clot extension on different implant surfaces: an in vitro study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;74:636–642.

endothelial cells to metallic implant surfaces. *J Mater Sci Mater Med*. 2000;11:279-85.

Fredman G, Serhan CN. Specialized pro-resolving lipid derived fatty acid mediators: wiring the circuit of effector immune homeostasis. *Oral wound healing: cell biology and clinical management*. Edited by Hannu Larjava. Wiley-Blackwell, 2012.

Grassi S, Piattelli A, de Figueiredo LC, Feres M, de Melo L, Iezzi G, Alba RC Jr, Shibli JA. Histologic evaluation of early human bone response to different implant surfaces. *J Periodontol* 2006;77:1736–1743.

Gretzer C, Gisselält K, Liljensten E, Rydén L, Thomsen P. Adhesion, apoptosis and cytokine release of human mononuclear cells cultured on degradable poly (urethane urea), polystyrene and titanium in vitro. *Biomaterials*. 2003 Aug;24(17):2843-52.

Hong J, Andersson J, Ekdahl KN, Elgue G, Axén N, Larsson R, Nilsson B. Titanium is a highly thrombogenic biomaterial: possible implications for osteogenesis. *Thromb Haemost* 1999; 82:58–64.

Iezzi G, Degidi M, Piattelli A, Shibli JA, Perrotti V. A histological and histomorphometrical evaluation of retrieved human implants with a wettable, highly hydrophilic, hierarchically microstructured surface: a retrospective analysis of 14 implants. *Implant Dent*. 2013 Apr;22(2):138-42.

Jaffin RA, Berman CL. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone. A 5-year analysis. *J Periodontol* 1991; 62:2-4.

Kawahara I, Takano Y. Segregated localization of immunocompetent cells and osteoclasts in the periodontal ligament of the rat molar. *Arch Histol Cytol*. 1995;58:345-55

Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol*. 2003 Jun; 74(6):858-64.

Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *J Biomed Mater Res*. 1996;32:409-17.

Kitsugi T, Nakamura T, Oka M, Yan WQ, Goto T, Shibuya T, Kokubo T, Miyaji S. Bone bonding behavior of titanium and its alloys when coated with titanium oxide (TiO₂) and titanium silicate (Ti₅Si₃). *J Biomed Mater Res*. 1996;32:149-56.

Lekholm U. Immediate early / loading of oral implants in compromised patients. *Periodontol*. 2003; 33: 194-203

Mangano C, Raspanti M, Traini T, Piattelli A, Sammons R. Stereo imaging and cytocompatibility of a model dental implant surface formed by direct laser fabrication. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Mar 1;88(3):823-31

Mangano C, Piattelli A, Scarano A, Raspanti M, Shibli JA, Mangano FG, Perrotti V, Iezzi G. A light and scanning electron microscopy study of human direct laser metal forming dental implants. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2014 Jan-Feb;34(1):e9-17. doi: 10.11607/prd.1213.

Matsuo M, Nakamura T, Kishi Y, Takahashi K. Microvascular changes after placement of titanium implants: scanning electron microscopy observations of machined and titanium plasma-sprayed implants in dogs. *J Periodontol*. 1999 Nov;70(11):1330-8.

Meyer AE, Baier RE, Natiella JR, Meenaghan MA. Investigation of tissue/implant interactions during the first two hours of implantation. *J Oral Implantol*. 1988;14(3):363-79

Moura CC, Machado JR, Silva MV, Rodrigues DB, Zanetta-Barbosa D, Jimbo R, Tovar N, Coelho PG. Evaluation of human polymorphonuclear behavior on textured titanium and calcium-phosphate coated surfaces. *Biomed Mater*. 2013 Jun;8(3):035010.

Oakley C, Larjava H. Hemostasis, coagulation and complications. Oral wound healing: cell biology and clinical management. Edited by Hannu Larjava. Wiley-Blackwell, 2012.

Ota-Tsuzuki C, Datte CE, Nomura KA, Gouvea CLA, Shibli JA. Influence of titanium surface treatments on formation of the blood clot extension. *J Oral Implantol*. 2011 Dec;37(6):641-7

Park JY, Davies JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2000; 11:530–539.

Park JY, Gemmell CH, Davies JE. Platelet interactions with titanium: Modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials* 2001;22:2671–2682

phenotype, and function. *Am J Pathol.* 2011 Jan;178(1):19-25.

Protivínský J, Appleford M, Strnad J, Helebrant A, Ong JL. Effect of chemically modified titanium surfaces on protein adsorption and osteoblast precursor cell behavior. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007 Jul-Aug;22(4):542-50.

Refai AK, Textor M, Brunette DM, Waterfield JD. Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Biomed Mater Res A.* 2004 Aug 1;70(2):194-205

Schweikl H, Muller R, Englert C, Hiller KA, Kujat R, Nerlich M, Schmalz G. Proliferation of osteoblasts and fibroblasts on model surfaces of varying roughness and surface chemistry. *J Mater Sci Mater Med.* 2007;18:1895-905.

Shibli JA, Martins MC, Nociti Jr. FH, Garcia VG, Marcantonio Jr. E. Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. *J Periodontol.* 2003;74:338- 345.

Shibli JA, Grassi S, de Figueiredo LC, Feres M, Iezzi G, Piattelli A. Human peri-implant bone response to turned and oxidized titanium implants inserted and retrieved after 2 months. *Implant Dent.* 2007 Sep;16(3):252-9.

Shibli JA, Mangano C, Mangano F, Cassoni A, Rodrigues JA, Bechara K, Ferreira JDB, Piattelli A. Bone-to-implant contact around immediately loaded direct laser metal forming (DLMF) transitional implants in posterior maxilla. *J Periodontol.* 2013 Jun; 84(6):723-7

Smith DE, Zarb GA. Criteria for success of osseointegrated endosseous implants. *J Prosthet Dent* 1989; 62: 567–572

Smith RA, Mosesson MW, Daniels AU, Gartner TK. Adhesion of microvascular endothelial cells to metallic implant surfaces. *J Mater Sci Mater Med.* 2000;11:279-85.

Turabelidze A, DiPietro LA. Inflammation and wound healing. *Oral wound healing: cell biology and clinical management.* Edited by Hannu Larjava. Wiley-Blackwell, 2012.

Thor A, Rasmusson L, Wennerberg A, Thomsen P, Hirsch JM, Nilsson B, Hong J. The role of whole blood in thrombin generation in contact with various titanium surfaces. *Biomaterials*. 2007;28: 966–974

Traini T, Caputi S, Gherlone E, Degidi M, Piattelli A. Fibrin Clot Extension on Zirconia Surface for Dental Implants: A Quantitative In Vitro Study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013 Jan 11. doi: 10.1111/cid.12038. [Epub ahead of print]

Villar CC, Huynh-Ba G, Mills MP, Cochran DL. Wound healing around dental implants. *Oral wound healing: cell biology and clinical management*. Edited by Hannu Larjava. Wiley-Blackwell, 2012.

Wen X, Wang X, Zhang N. Microrough surface of metallic biomaterials: A review. *Biomed Mater Eng*. 1996; 6:173-189.

Zechner W, Tangl S, Fürst G, Tepper G, Thams U, Mailath G, Watzek G. Osseous healing characteristics of three different implant types. A histological and histomorphometric study in mini-pigs. *Clin Oral Implant Res*. 2003;14:150-157.

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