

Pedro Manuel Vasconcelos Mesquita

**Avaliação do comportamento
de células osteoblásticas na presença
de diferentes superfícies de implantes**

PORTO – 2009

Capa: Imagem de Microscopia Electrónica de Varrimento da camada celular presente na superfície de um implante, contendo estruturas globulares mineralizadas, aos 28 dias de cultura.

*Dissertação de candidatura ao grau de Doutor
apresentada à Faculdade de Medicina Dentária
da Universidade do Porto*

Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Membros do Conselho Científico

Professor Doutor António Cabral Campos Felino – *Presidente*
Professor Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes – *Vice-presidente*
Prof. Doutor Acácio Eduardo Soares Couto Jorge
Professor Doutor Afonso Manuel Pinhão Ferreira
Prof. Doutor Américo dos Santos Afonso
Prof^a. Doutora Ana Paula Coelho Macedo Augusto
Prof. Doutor António Marcelo Azevedo Miranda
Prof. Doutor César Fernando Coelho Leal Silva
Prof. Doutor David José Casimiro Andrade
Professor Doutor Fernando Jorge Morais Branco
Prof. Doutor Filipe Poças Almeida Coimbra
Prof. Doutor Germano Neves Pinto Rocha
Prof^a. Doutora Inês Alexandra Costa Morais Caldas
Prof^a. Doutora Irene Graça Azevedo Pina Vaz
Prof. Doutor João Carlos Gonçalves Ferreira de Pinho
Professor Doutor João Fernando Costa Carvalho
Professor Doutor Jorge Manuel Carvalho Dias Lopes
Prof. Doutor José Albertino Cruz Lordelo
Prof. Doutor José Albino Teixeira Koch
Prof. Doutor José António Ferreira Lobo Pereira
Prof. Doutor José António Macedo Carvalho Capelas
Prof. Doutor José Carlos Reis Campos
Prof. Doutor José Mário de Castro Rocha
Prof. Doutor Manuel José Fontes de Carvalho
Prof^a. Doutora Maria Benedita Garrett Sampaio Maia
Prof^a. Doutora Maria Cristina P. C. M. Figueiredo Pollman
Prof^a. Doutora Maria Helena Guimarães Figueiral da Silva
Professora Doutora Maria Helena Raposo Fernandes
Prof^a. Doutora Maria Lurdes Ferreira Lobo Pereira
Professora Doutora Maria Purificação Valenzuela Sampaio Tavares
Prof^a. Doutora Maria Teresa Pinheiro Oliveira Rodrigues Carvalho
Professor Doutor Mário Jorge Rebolho Fernandes Silva
Prof. Doutor Mário Ramalho Vasconcelos
Professor Doutor Miguel Fernando Silva Gonçalves Pinto
Prof. Doutor Paulo Rui Galvão Ribeiro Melo
Prof. Doutor Ricardo Manuel Lobo Faria de Almeida

Docentes Jubilados

Professor Doutor Adão Fernando Pereira
Prof. Doutor Amílcar Almeida Oliveira
Prof. Doutor António Manuel Machado Capelas †
Dr. António Ulisses Matos dos Santos
Professor Doutor Francisco António Rebelo Morais Caldas
Prof. Doutor Durval Manuel Belo Moreira
Dr. José Maria Vaz Osório
Professor Doutor José Serra Silva Campos Neves
Prof. Doutor Manuel Desport Marques †
Prof. Doutor Manuel Guedes de Figueiredo

Docentes Aposentados

Prof. Doutor António Manuel Guerra Capelas
Prof. Dr. Artur Manuel Osório de Araújo
Professor Doutor Fernando José Brandão Martins Peres
Professor Doutor José Carlos Pina Almeida Rebelo
Professor Doutor Manuel Pedro Fonseca Paulo
Prof^a. Doutora Maria Adelaide Macedo Carvalho Capelas
Professor Doutor Rogério Serapião Martins Aguiar Branco

*Aos meus pais
A quem tudo devo
Pelo amor, incentivo e apoio incondicional, em todas as horas*

*À minha irmã Susana
Pela sua amizade e pela força que me transmite nos momentos difíceis*

*À Mi
Pela sua grande amizade e por estar presente, sempre que necessário*

*À Luisa
à Inês, ao João Pedro e à Sofia
Pelas longas horas de ausência
Pela compreensão que manifestaram
Pela ajuda e apoio que sempre me deram*

*Ao Excelentíssimo Senhor
Prof. Doutor Américo dos Santos Afonso*

*À Excelentíssima Senhora
Professora Doutora Maria Helena Raposo Fernandes*

*Ao Excelentíssimo Senhor
Professor Doutor António Cabral Campos Felino*

Aos meus Mestres

*Aos Docentes
da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto*

*“If you want to live a happy life, tie it to a goal,
not to people or things.”*

Albert Einstein (Físico norte-americano de origem alemã.
Prémio Nobel da Física em 1921. 1879-1955)

“Pain is temporary. Quitting lasts forever.”

Lance Armstrong (Ciclista norte-americano, vencedor da
Volta a França sete vezes consecutivas. 1971-)

ÍNDICE

Agradecimentos.....	xix
Palavras-chave / Keywords.....	xxi
Siglas e abreviaturas.....	xxiii
Resumo / Abstract.....	xxv
Capítulo I – Contexto e objetivos do trabalho.....	1
Capítulo II – Introdução.....	11
1. Implantes dentários.....	11
1.1. Tipo de implantes.....	12
1.2. Características dos implantes.....	12
1.2.1. Propriedades mecânicas.....	13
1.2.1.1. Macroestrutura, forma e desenho dos implantes.....	14
1.2.1.2. Comprimento dos implantes.....	15
1.2.1.3. Diâmetro dos implantes.....	15
1.2.2. Propriedades topográficas.....	16
1.2.3. Propriedades físico-químicas.....	18
1.2.3.1. Características físicas.....	18
1.2.3.2. Características químicas.....	20
1.3. Tratamentos de superfície.....	22
1.4. Materiais utilizados no fabrico de implantes dentários.....	23
2. Tecido ósseo.....	28
2.1. Matriz óssea.....	28
2.2. Células.....	30

Índice

2.3. Estrutura do tecido ósseo	33
2.3.1. Estrutura morfológica.....	33
2.3.2. Estrutura macroscópica	33
2.3.3. Estrutura microscópica.....	35
2.4. Periósseo e endósseo.....	36
2.5. Osteogénese.....	37
2.6. Papel metabólico do tecido ósseo.....	37
2.7. Crescimento e remodelação óssea.....	39
2.8. Reparação óssea.....	40
3. Comportamento biológico dos implantes no tecido ósseo	41
3.1. Materiais bio-inertes, biotolerados e bioactivos.....	42
3.2. Osteointegração.....	42
3.2.1. Interface osso-implante de titânio.....	44
3.2.2. Influência das superfícies na osteointegração.....	46
4. Técnicas utilizadas na análise das superfícies dos implantes.....	49
4.1. Análise da topografia.....	50
4.1.1. Linhas orientadoras para a análise das superfícies.....	55
4.2. Análise química de superfície.....	55
5. Modelos experimentais com culturas celulares.....	56
5.1. Diferenciação osteoblástica.....	59
5.2. Marcadores osteoblásticos.....	60
5.2.1. Colagénio tipo I.....	61
5.2.2. Fosfatase alcalina.....	61
5.2.3. Osteopontina.....	61
5.2.4. Osteocalcina.....	61
5.2.5. Osteonectina.....	62
5.2.6. Osteoprotegerina.....	62
5.2.7. Proteína morfogénica óssea 2 (BMP-2).....	62

Capítulo III – Materiais e métodos	63
1. Implantes utilizados.....	63
2. Preparação das amostras utilizadas nas culturas celulares.....	67
2.1. Corte dos implantes.....	67
2.2. Lavagem e esterilização das amostras.....	69
3. Caracterização da superfície dos implantes.....	72
3.1. Macro e microtopografia.....	74
3.1.1. Análise qualitativa por Microscopia Electrónica de Varrimento.....	74
3.1.2. Perfil 3D dos implantes.....	75
3.1.3. Rugosidade da superfície.....	76
3.1.3.1. Procedimentos analíticos e estatísticos.....	78
3.2. Composição química da superfície.....	78
3.2.1. Procedimentos analíticos e estatísticos.....	79
4. Comportamento de culturas de células osteoblásticas humanas na superfície dos implantes.....	80
4.1. Culturas celulares.....	80
4.2. Caracterização do comportamento celular.....	81
4.2.1. Microscopia Confocal de Varrimento Laser.....	81
4.2.2. Microscopia Electrónica de Varrimento.....	82
4.2.3. Actividade da fosfatase alcalina.....	82
4.2.4. Expressão génica de marcadores osteoblásticos.....	83
4.2.5. Concentração de cálcio ionizado (Ca_i) no meio de cultura.....	83
4.2.6. Procedimentos analíticos e estatísticos.....	84

Capítulo IV – Resultados	87
1. Caracterização da superfície dos implantes	87
1.1. Macro e microtopografia	87
1.1.1. Análise qualitativa por Microscopia Electrónica de Varrimento.....	87
1.1.2. Perfil 3D dos implantes.....	94
1.1.3. Rugosidade das superfícies.....	100
1.1.3.1. Profilometria mecânica.....	100
1.2. Composição química.....	110
1.2.1. Análise por espectrometria por fotões de raios-X (XPS).....	110
1.2.2. Análise por espectrometria de raios-X por energia dispersante (EDS).....	128
2. Comportamento biológico dos implantes.....	132
2.1. Adesão celular à superfície dos implantes.....	132
2.2. Organização do citoesqueleto e morfologia celular	134
2.3. Padrão de crescimento celular	137
2.4. Actividade da fosfatase alcalina.....	143
2.5. Expressão génica de marcadores osteoblásticos.....	146
2.6. Mineralização da matriz extracelular	147
Capítulo V – Discussão	159
Capítulo VI – Conclusões	187
Linhas de investigação futura	191
Bibliografia.....	193
Índice de figuras, tabelas e gráficos.....	213
Anexos.....	223

AGRADECIMENTOS

Um trabalho desta natureza não poderia ser bem sucedido sem a preciosa ajuda de inúmeras pessoas. Todas elas permitiram, de uma ou de outra forma, superar as dificuldades surgidas ao longo do percurso. Para que o resultado final não fique associado apenas a uma pessoa, esquecendo todas as outras, não posso deixar de aqui prestar, a mais justa e elementar homenagem. A todos agradeço de maneira sentida:

- Ao Prof. Doutor Américo dos Santos Afonso, como orientador desta tese, pela amizade que nos une há muitos anos, pela confiança que em mim tem depositado, pelos sábios ensinamentos que sempre me transmitiu, pela sua dedicação, competência, superior orientação, apoio e incentivo que possibilitaram a realização deste trabalho e, acima de tudo, porque a ele devo a minha entrada na vida académica e o gosto pela investigação.
- À Professora Doutora Maria Helena Raposo Fernandes, co-orientadora desta tese, manifesto o meu reconhecimento e gratidão pela enorme simpatia e amizade com que sempre me recebeu; pelo apoio, pela dedicação, pela disponibilidade, pelo incentivo à realização desta dissertação e pela paciência demonstrada na partilha dos seus grandes conhecimentos e experiência na área da investigação.
- Ao Professor Doutor António Cabral Campos Felino, co-orientador desta tese, pela amizade que, desde sempre, nos une, pelo seu apoio e incentivo à realização deste trabalho, pela partilha dos seus grandes conhecimentos e pela sua ligação, muito forte, a toda a minha formação académica pós-graduada.
- Ao Professor Doutor Afonso Manuel Pinhão Ferreira, Presidente do Conselho Directivo da FMDUP, pelo incentivo e pelo apoio na criação das condições necessárias à realização deste trabalho.
- À Doutora Paula Sampaio (IBMC) pela amizade e simpatia com que sempre me recebeu e pelo apoio incansável e incondicional na visualização e aquisição de imagens em Microscopia Confocal de Varrimento Laser.
- Ao Doutor Carlos Sá e a toda a sua equipa do Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP) pela colaboração e ajuda na determinação da composição química dos implantes, bem como, pela sua grande simpatia e disponibilidade.
- Aos Profs. Doutores Mário Augusto Pires Vaz, Jorge Humberto Oliveira Seabra e Ramiro Carneiro Martins, da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, pela simpatia e pela prestimosa colaboração na caracterização da rugosidade das superfícies implantares.

Agradecimentos

- Ao Dr. Álvaro Azevedo pela grande amizade, profissionalismo, dedicação, sentido de ajuda e pela sua inesgotável disponibilidade no tratamento estatístico dos dados.
- Ao Dr. Pedro de Sousa Gomes, do Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, agradeço o apoio incansável na visualização e aquisição de imagens de Microscopia Confocal de Varrimento Laser das culturas celulares.
- À Prof^a. Doutora Inês Alexandra Costa Morais Caldas pela amizade e pela ajuda na obtenção de artigos científicos.
- Ao Prof. Doutor João Espregueira-Mendes pela colaboração na obtenção de amostras de medula óssea humana.
- À Técnica Dra. Raquel Almeida Palmas, do Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, pela ajuda na realização das culturas celulares.
- Ao Sr. Emanuel Carvalho Monteiro agradeço a preparação das amostras para Microscopia Electrónica de Varrimento.
- À D. Delfina Alves e ao Sr. José Pinto pela amizade e pelo apoio incondicional prestado na pesquisa bibliográfica necessária à boa execução deste trabalho e pela colaboração na obtenção de artigos científicos.
- À Sr^a Glúcia Morim e aos Sr^{es} Jesus Toboso Ramón e Felix Gonzalez Yoldi, da Empresa Eckermann, pela amizade que nos une e por nos terem cedido, gentilmente, parte dos implantes utilizados neste trabalho.
- Ao Sr. Franco Di Cicco e ao Sr. Ricardo Monteiro, da Empresa Sweden-Martina, por nos terem cedido, gentilmente, parte dos implantes utilizados neste trabalho.
- À Técnica D. Ana Mota pela amizade de longa data e pelo incentivo que me deu nas horas mais difíceis da realização deste trabalho.
- À D. Eduarda Falcão pela amizade e elevada estima que nos une, desde os meus tempos de estudante, nesta faculdade.
- À Dr^a. Luisa Gonçalves pela amizade e pela preciosa colaboração na obtenção de material bibliográfico.
- Ao Professor Doutor Fernando José Brandão Martins Peres por um dia, pouco depois de me ter licenciado, ter acreditado no meu valor.
- Às minhas assistentes, Teresa e, principalmente à Carla, agradeço a amizade, o apoio e toda a compreensão demonstrada nos momentos difíceis.
- Aos meus amigos, companheiros de atletismo, Hamilton e Marta, pela amizade e pelo apoio nos bons e maus momentos.

PALAVRAS-CHAVE

Implantologia oral

Implantes dentários

Titânio comercialmente puro

Superfície implantar

Rugosidade superficial

Composição química superficial

In vitro

Células osteoblásticas humanas

KEYWORDS

Oral implantology

Dental implants

Titanium commercially pure

Implant surface

Surface roughness

Surface chemical composition

In vitro

Osteoblastic-human cells

SIGLAS E ABREVIATURAS

Al	-	Alumínio
ALP	-	Fosfatase alcalina
AES	-	Espectrometria de electrões Auger
BMP-2	-	Proteína morfogénica óssea 2
C	-	Carbono
CAE	-	<i>Constant Analyzer Energy</i>
Cbfa1	-	<i>core-binding factor α</i>
Ca _i	-	Cálcio ionizado
COL 1	-	Colagénio tipo I
cpTi	-	Titânio comercialmente puro
EDS	-	Espectrometria de raios-X por energia dispersante
F	-	Flúor
FRC	-	Células osteoprogenitoras multi-potentes provenientes da calvária de feto de rato
GADPH	-	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
HA	-	Hidroxiapatite
MANOVA	-	Anova para medidas repetidas
MEV	-	Microscopia Electrónica de Varrimento
MG63	-	Células osteoblásticas imaturas provenientes de osteosarcomas humanos
MLO-Y4	-	Células tipo osteócito provenientes de ratos ratos transgénicos
µm	-	Micrómetro
nm	-	Nanómetro
O	-	Oxigénio
OCT-1	-	Células tipo osteoblasto maduro provenientes de ratos transgénicos
OPG	-	Osteoprotegerina
UMR-BSP	-	Linha celular osteoblástica derivada de osteosarcomas de ratos
Pb	-	Chumbo
PBS	-	Solução de fosfato tamponada
P	-	Fósforo
P _i	-	Fósforo ionizado
RANKL	-	<i>Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand</i>
RT-PCR	-	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
SLA	-	<i>(S)andblasted, (L)arge grit, (A)cid-etched</i>

SEM	-	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
Si	-	Silício
SIMS	-	Espectrometria secundária de massa iónica
Ti	-	Titânio
TPS	-	<i>Spray</i> de plasma de titânio
TGF- β	-	<i>Transforming growth factor</i> - β
XPS	-	Espectrometria por fotões de raios-X

RESUMO

O titânio é presentemente, o material mais utilizado na confecção de implantes dentários pelas excelentes propriedades que apresenta, nomeadamente quanto à sua biocompatibilidade e segurança biológica. Possui, ainda, a enorme vantagem de ser extremamente reactivo, quando em presença do ar ou de fluidos biológicos, devido à sua elevada energia de superfície, formando-se, de maneira espontânea, à superfície, uma camada de óxidos de titânio (TiO_2). É através desta camada que se estabelecem as ligações com os componentes do sistema biológico. A sua elevada reactividade explica igualmente o facto de, poucos segundos após contacto com o ar, se depositem, à superfície, contaminantes, formados maioritariamente por compostos de carbono. Estes, diminuem a disponibilidade das ligações livres podendo, desta forma, ocorrer uma diminuição da resposta osteoblástica.

As características da superfície dos implantes revestem-se de uma importância extrema uma vez que é nessa zona que ocorrem as reacções biológicas que conduzem, quando as condições são favoráveis, à osteointegração. Factores como a microtopografia, nomeadamente a rugosidade, e a composição química superficial são importantes pois podem condicionar a osteogénese, desde as fases moleculares até às fases celulares, devendo ser analisados sempre que se procuram interpretar resultados referentes ao fenómeno da osteointegração e ao desempenho de implantes. Microtopografia, rugosidade e composição química da superfície estão intimamente interligadas, uma vez que, modificando uma modificam-se as outras. Em certa medida, todas elas são influenciadas pelo tipo de tratamento de superfície preconizado.

No presente trabalho procurou-se analisar a influência destas variáveis na resposta osteoblástica. Para isso, seleccionamos implantes que foram divididos em seis grupos: grupos 1 e 2 – implantes maquinados diferindo entre si no número de espiras e no seu afastamento (macroestrutura diferente), grupos 3, 4 e 5 – implantes submetidos a jacteamto e ataque ácido, segundo protocolos diferentes. Os implantes do grupo 3 apresentavam a mesma macroestrutura dos implantes do grupo 1. Os implantes do grupo 5 eram, segundo o fabricante, uma evolução dos implantes do grupo 4, apresentando a mesma macroestrutura e o mesmo tipo de tratamento de superfície embora realizado segundo um protocolo distinto, grupo 6 – implantes revestidos a *spray* de plasma de titânio apresentando a mesma macroestrutura dos implantes do grupo 2. Nenhum dos protocolos de tratamento de superfície foi revelado pelos fabricantes. Com esta selecção, foi intenção, comparar o comportamento biológico de implantes que apresentavam, de alguma forma, diferenças, entre si, mais concretamente, a) implantes com macroestrutura diferente; b) implantes com a mesma macroestrutura mas com

tratamento de superfície, logo microtopografias, diferentes e c) implantes com a mesma macroestrutura, submetidos a tratamentos de superfície com a mesma designação, mas realizados segundo protocolos diferentes, logo com menos diferenças microtopográficas, pelo menos em termos teóricos.

A experimentação, *in vitro*, e as comparações realizadas foram baseadas na observação qualitativa, com recurso a Microscopia Electrónica de Varrimento e à Microscopia Confocal de Varrimento Laser, da adesão celular, da morfologia celular e da organização do citoesqueleto, do padrão de crescimento celular e da eventual formação de depósitos mineralizados. Procedeu-se igualmente, à quantificação da actividade da fosfatase alcalina, à observação da expressão dos genes do colagénio tipo I, da fosfatase alcalina, da osteoprotegerina e da proteína morfogénica óssea 2 (BMP-2) e à quantificação do consumo do cálcio ionizado (Ca_i), ao longo do tempo de cultura.

Numa primeira fase do trabalho, os implantes foram caracterizados sob o ponto de vista da sua macro e microestrutura. Foi determinada a sua rugosidade e a sua composição química, com recurso à profilometria mecânica e às técnicas de análise XPS e EDS, respectivamente. Em termos de rugosidade verificaram-se valores crescentes, desde o grupo 1 até ao grupo 6. Foram encontrados valores inferiores a $0,5 \mu\text{m}$ para os grupos 1 e 2, formados por implantes maquinados. Os implantes submetidos a jacteamto e ataque ácido apresentaram valores intermédios, superiores a $0,5 \mu\text{m}$ e inferiores a $1,5 \mu\text{m}$. Os implantes revestidos a *spray* de plasma de titânio, pertencentes ao grupo 6, apresentaram os valores de rugosidade mais elevados, superiores a $2,5 \mu\text{m}$. Apenas não foram observadas diferenças, com significado estatístico, entre os grupos 3 e 4. Quanto à composição química, confirmou-se a presença de núcleos com composição química semelhante, formados por titânio comercialmente puro, e superfícies maioritariamente formadas por titânio e oxigénio, sob a forma de óxido de titânio. Foi observada grande concentração de carbono em todos os grupos, com excepção do grupo 6. Na análise da composição química também foram feitas comparações com base, não nos grupos, mas sim em classes, que resultaram do agrupamento dos implantes de acordo com o tipo de tratamento de superfície preconizado: classe 1 – implantes maquinados, formada pelos implantes pertencentes aos grupos 1 e 2, classe 2 – implantes submetidos a jacteamto e ataque ácido, formada pelos implantes pertencentes aos grupos 3, 4 e 5 e classe 3, formada pelos implantes revestidos a *spray* de plasma de titânio, formada pelos implantes do grupo 6. Entre as classes 1 e 2 não foram observadas diferenças, com significado, para os elementos em análise, com excepção do elemento chumbo que só foi encontrado em implantes maquinados, pertencentes à classe 1. Foram observadas diferenças, com significado, para todos os elementos, entre as classes 1 e 3, o mesmo se passando entre as classes 2 e 3, com excepção do elemento chumbo, uma vez que não foi encontrado este elemento em nenhuma destas duas classes. Contrariamente ao que é

referido na literatura, no nosso estudo não foram observadas diferenças significativas, na composição química de implantes maquinados e submetidos a jactemento e ataque ácido provavelmente devido à contaminação exterior, que sempre ocorre, apesar dos cuidados tidos no seu manuseamento e, provavelmente, devido ao facto dos implantes terem sido submetidos a uma esterilização prévia, em autoclave, para garantir condições iguais, entre eles, nas diferentes fases da experimentação, topográfica e biológica.

Da análise do comportamento biológico, verificou-se que todos os implantes, independentemente da sua macro, microtopografia, rugosidade e composição química de superfície, demonstraram capacidade para formarem depósitos mineralizados, indicativo da possibilidade de ocorrer a formação óssea e a consequente osteointegração, em ambiente *in vivo*.

Com base nos parâmetros analisados observaram-se, no entanto, diferenças no seu comportamento biológico, com implantes a desenvolverem uma organização mais complexa, mais rica, confirmada através da quantificação da actividade da fosfatase alcalina e do consumo de Ca_i .

Os implantes que revelaram, no conjunto dos parâmetros analisados, melhor comportamento biológico, foram os pertencentes aos grupos 3 e 5, seguidos dos implantes pertencentes ao grupo 6. Os implantes dos grupos 1 e 2, maquinados, apresentaram um comportamento biológico mais fraco, o mesmo tendo sucedido com os implantes do grupo 4, submetidos a jactemento e ataque ácido, que tiveram um desempenho semelhante ao dos maquinados. Não foram observadas diferenças no comportamento dos implantes dos grupos 1 e 2, ambos maquinados, mas com macroestrutura diferente, quando comparados entre si. Foram observadas diferenças com significado estatístico, entre os implantes dos grupos 1 e 3, com macroestrutura semelhante mas diferente microestrutura bem como, entre os implantes do grupo 6 comparativamente com os do grupo 2, também apresentando a mesma macroestrutura mas diferente microestrutura. Os implantes do grupo 5 apresentaram um comportamento biológico bastante superior aos do grupo 4. Ambos apresentavam a mesma macroestrutura e o mesmo tratamento de superfície, embora realizado segundo protocolos diferentes, susceptíveis de induzir diferenças ao nível da rugosidade e da sua microestrutura. Conforme indicação do fabricante, os implantes do grupo 5 constituíam uma evolução dos implantes do grupo 4, o que se confirmou, no nosso estudo, com os implantes do grupo 5 a demonstrarem um desempenho muito superior, a todos os níveis.

Parece assim evidente, da análise dos resultados, que a microestrutura desempenha um papel fundamental na osteogénese, uma vez que, implantes com macroestrutura igual, como os pertencentes aos grupos 1 e 3 e os pertencentes aos grupos 2 e 6, apresentaram comportamentos biológicos diferentes, com vantagem evidente para os

implantes sujeitos a tratamento de superfície e com microestrutura mais elaborada. Também parece evidente que a rugosidade influencia o comportamento das células osteoblásticas sendo as rugosidades médias situadas entre 0,5 μm -1,5 μm aquelas que proporcionaram o melhor comportamento osteoblástico. Os implantes com rugosidade mais elevada apresentaram valores de actividade da fosfatase alcalina e consumo do Ca_i comparáveis aos obtidos pelos implantes submetidos a jactamento e ataque ácido, embora com um comportamento biológico menos complexo. Quanto à composição química não foi possível estabelecer conclusões quanto à sua influência, positiva ou negativa, no comportamento biológico das células osteoblásticas já que, por um lado, as diferenças entre grupos e classes não foram suficientemente claras e, por outro, revelou-se difícil isolar este factor dos outros dois, microtopografia e rugosidade, cuja influência foi muito mais evidente.

Em conclusão, não chega designar os implantes pelo nome do tratamento de superfície a que foram submetidos, uma vez que, implantes com o mesmo tipo de tratamento podem apresentar desempenhos biológicos significativamente diferentes.

Por outro lado, e apesar de não ter sido esse o objectivo do nosso trabalho, verificamos que os implantes dos grupos 3 e 5 foram os que apresentaram os melhores desempenhos, confirmando que as rugosidades intermédias, compreendidas entre os 0,5 μm -1,5 μm , conseguidas através de jactamento e ataque ácido das superfícies, são as que proporcionam os melhores resultados justificando, em certa medida, a opção presente, da generalidade das marcas comerciais, em fabricar implantes submetidos a este tipo de tratamento.

Será importante, passar agora para uma segunda fase de investigação, com a realização de experimentação *in vivo*, utilizando estes mesmos tipos de implantes. Só assim será possível confirmar, ou não, os resultados obtidos *in vitro*.

ABSTRACT

Titanium is currently the most common material used for making dental implants because of its excellent properties, particularly concerning with biocompatibility and biological safety. It also has the huge advantage of being extremely reactive, in the presence of air or biological fluids, because of their high surface energy, forming, spontaneously, a layer of titanium dioxide (TiO_2). It is through this layer that connections are established with the components of the biological environment. This high reactivity may also explain the deposition of surface contaminants, in a few seconds after contact with air, consisting mainly of carbon compounds. This decreases the availability of free surface binding structures which can thus reduce the osteoblastic response.

The surface characteristics of the implants are of extreme importance since this is the area where biological reactions, that lead, when conditions are favorable for osseointegration, occurs. Because factors such as microtopography, surface roughness and surface chemistry are important to osteogenesis, from the early molecular to cellular phases, they should be considered when analyzing results for the phenomenon of osseointegration and implant performance. These surface characteristics are closely linked, since modifying one of them results in modifications on the others. To some extent, they are all influenced by the type of surface treatment accomplished.

In our work we analyze the influence of these variables on osteoblastic response. We've selected implants that were divided into six groups: groups 1 and 2 - machined implants differing in the number and spacing of the threads (differences on the macrostructure), groups 3, 4 and 5 - implants grit-blasted and acid-etched with different protocols. The group 3 implants had the same macrostructure of the group 1 implants. The group 5 implants were, according to the manufacturer, a development of the group 4 implants, with the same macrostructure and the same type of surface despite achieved with a different procedure and group 6 - implants coated with sprayed-plasma titanium. They had the same macrostructure of the group 2 implants. None of the protocols for the surface treatment were revealed by the manufacturers. With this selection, it was our aim to compare the biological behavior of implants that had, in some way, differences between themselves and more specifically compare implants that had, a) different macrostructures, b) the same macrostructure but submitted to different surface treatments and so, with different microtopographies, c) the same macrostructure and the same type of surface treatment achieved by different protocols, with fewer microtopography differences, at least theoretically.

The *in vitro* trial and the comparisons were based on qualitative analysis using scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy, cell adhesion, cell morphology and cytoskeleton organization, the cell growth pattern and the possible formation of mineralized deposits. We did also the measurement of alkaline phosphatase activity, the monitoring of gene expression of type I collagen, alkaline phosphatase, osteoprotegerin and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and the measurement of the consumption of ionized calcium (Ca_i), over time of culture.

In the first phase of our investigation, the implants were characterized in terms of their macro and microstructure. It was given its roughness and its chemical composition, using a mechanical profilometry and XPS and EDS analysis techniques, respectively. In terms of roughness values were found increasing from group 1 to group 6. Found values below 0.5 μm for groups 1 and 2, made up of machined implants. Grit-blasted and acid-etched implants showed intermediate values, higher than 0.5 μm but below 1.5 μm . Implants coated with plasma sprayed titanium, belonging to group 6, showed higher roughness values, higher than 2.5 μm . There were differences with statistical significance between all the groups except between groups 3 and 4. The chemical composition analysis confirmed similar cores for the six groups made of commercially pure titanium and surfaces mainly composed of titanium and oxygen in the form of titanium dioxide. A higher concentration of the element carbon was observed in all groups except for group 6. For the chemical analysis comparisons were made based in classes that resulted from grouping the implants according to the type of surface treatment performed: class 1 - machined implants grouping implants belonging to groups 1 and 2, class 2 – grit-blasted and acid-etched implants grouping implants from groups 3, 4 and 5 and class 3, formed by implants coated with sprayed-plasma titanium composed by implants belonging to group 6. There were no relevant differences between classes 1 and 2 for the elements under consideration with the exception of the lead element which were only found in machined implants, belonging to class 1. Significant differences were observed for all elements, between classes 1 and 3. The same is true for classes 2 and 3 again except for the element lead, since this chemical element wasn't found in any of these two classes. Despite what is reported in the literature, in our study there were no significant differences in the chemical composition of machined and grit-blasted/acid-etched implants probably due to outside contamination, which always occurs, despite the care one might take in handling them and probably also because the implants were sterilized with a steam autoclave, prior to their use, to ensure equal conditions, among them, for the various stages, topographic and biological, of the trial.

From the biological behavior analysis, it was found that all implants, irrespective of the macro, microtopography, roughness and surface chemistry, demonstrated ability to

form mineralized deposits, indicating the possibility of occurrence of bone formation and subsequent osseointegration in a living environment.

Based on these parameters there were observed, however, differences in biological behavior, with implants developing a more complex and richer cellular architecture confirmed by quantification of alkaline phosphatase activity and calcium consumption.

Based on all parameters analysed, implants belonging to groups 3 and 5 showed a better biological behavior, followed by implants belonging to the group 6. Implants of Implants from group 1 and 2, machined, showed a biological behavior weaker. Implants from group 4, grit-blasted and acid-etched, showed a performance similar to that of machined implants. There were no significant differences in the behavior of the group 1 and 2 implants, both machined, but with different macrostructure, when compared with each other. Significant differences were observed between group 1 and 3 implants, with similar macrostructure but different microstructure and between group 6 and 2 implants, also featuring the same macrostructure but different microstructure. The group 5 implants showed a biological behavior rather better than the group 4 implants. Both have the same macrostructure and the same surface treatment, although achieved by different protocols, which may cause differences in the roughness and the microstructure. As required by the manufacturer, the group 5 implants constituted a positive change when compared with group 4 implants, which was confirmed in our study.

It seems so obvious from the analysis of our results that the microstructure plays a key role in osteogenesis, since implants with the same macrostructure, such those belonging to the groups 1 and 3 and those belonging to the groups 2 and 6, showed a very different biological behavior, with obvious benefits for implants subjected to surface treatment and with more elaborate microstructure. It also seems clear that the roughness influences the behavior of osteoblastic cells with the average roughness levels between 0.5-1.5 μm providing the best osteoblastic behavior. Implants with higher roughness values achieved alkaline phosphatase activity and consumption of Ca_i comparable to those obtained by grit-blasted and acid-etched implants but with a less complex biological behavior. It was not possible to draw conclusions based on chemical composition analysis on the positive or negative influence on the biological behavior of osteoblastic cells since on the one hand, the differences between groups and classes were not sufficiently clear and, secondly, it proved difficult to isolate this factor from the other two, microtopography and roughness, whose influence was much more evident.

In conclusion, it seems so clear that it is insufficient to designate implants only by the name of the surface treatment they have undergone, since implants with the same

kind of surface treatment may have significantly different biological performances. Moreover, although it was not the aim of our work, we found that implants belonging to groups 3 and 5 were the ones showing the best biological performances confirming that surfaces with intermediate roughness values, between 0.5-1.5 μm , achieved by grit-blasted and acid etching, may offer the best results. This justifies, to some extent, the present option of the majority of the trademarks, which choose to manufacture implants subjected to such treatments.

It seems important now to go to a second phase of research, with the implementation of *in-vivo* experiments, using these same types of implants. Only then, it will be possible to confirm or refute the results obtained during this *in-vitro* investigation.

CONTEXTO E OBJECTIVOS DO TRABALHO

O Homem tem, desde tempos imemoriais, procurado substituir a perda de estruturas do seu corpo causada por acidente, doença ou simplesmente por envelhecimento. Entre essas estruturas perdidas encontram-se, naturalmente, os dentes e os tecidos dentários. Desde o início da prática da medicina dentária que a perda de dentes constitui um problema e a forma de o solucionar continua, ainda hoje, a consumir grande parte do tempo e dos recursos da actividade do médico dentista.

Os objectivos da medicina dentária moderna são os de restaurar a função, a estética, a fonética, o conforto e a saúde normais, dos pacientes, independentemente da atrofia, da doença ou das lesões presentes. Para além da habilidade do médico dentista são igualmente importantes, na prossecução destes objectivos, os materiais dentários disponíveis, bem como, as técnicas operatórias necessárias à sua correcta utilização.

O tratamento de dentes, bem como a sua substituição, por perda, constituíam já uma preocupação na Antiguidade (1-5), denotando esses povos um elevado interesse pelos dentes e um significativo conhecimento dos diferentes materiais, com potencial utilização na resolução dos padecimentos da boca.

Desde tempos antigos que o Homem procura restaurar dentes, nuns casos, por motivos religiosos, noutros com o objectivo de embelezamento e só em alguns com fins terapêuticos. Existem relatos de tratamentos dentários realizados na Antiguidade, sendo aceite a existência, desde tempos remotos, de “práticos” altamente habilidosos e competentes nesta arte (3, 6). Um dos primeiros registos relacionados com a prática de tratamentos dentários, provavelmente com fins terapêuticos, data de há mais de 7500 anos (3). Há também relatos correspondentes às civilizações pré-colombianas, onde é referida a realização de preparações e restaurações dentárias visando o tratamento de maleitas dos dentes, provavelmente, não por motivos de ausência de saúde oral mas por questões religiosas (2, 5, 7).

A primeira utilização do ouro, na confecção de próteses dentárias, visando a substituição de dentes perdidos, remonta há mais de 2500 anos (8), havendo relatos que referem a sua utilização por povos como os Fenícios (séculos X - V a.C.), os Etruscos (séculos VIII - III a.C.), os Gregos (séculos VI - II a.C.) e os Romanos (séculos VII a.C - I d.C.).

Também os antigos Babilônios (2000 - 1200 a.C.), os Assírios (séculos XII - VII a.C.) e os Egípcios (3000 a.C.) já conheciam o ouro, bem como a prata, o cobre e o chumbo, utilizando-os na arte dentária (2, 4, 8). Os Fenícios, que controlaram o comércio do estanho entre os anos 1000 e 300 a.C., e que já conheciam e trabalhavam o ferro desde o ano 990 a.C., foram considerados os mais hábeis metalúrgicos do Mundo Antigo, tendo a sua perícia, para trabalhar estes materiais, sido utilizada também, na realização de *reabilitações* orais (2, 8). Nesse tempo, para além destes materiais, também eram muito utilizados, por variados povos, dentes humanos, dentes de animais e dentes esculpidos em marfim fixados aos dentes adjacentes com arames habitualmente, de ouro, com vista a substituir as peças dentárias perdidas, (2, 4, 8).

Relatos do Egito Antigo atestam a importância que assumia, para aquela civilização, a substituição das peças dentárias perdidas. Aí, procedia-se à implantação de dentes de animais ou dentes preparados a partir do marfim, nos locais desdentados, aquando da mumificação dos corpos, de forma a prepará-los para se alimentarem na vida que acreditavam existir para além da morte (1, 2).

Tal como na Antiguidade, no final do século XVI, osso ou marfim esculpidos eram também utilizados em países como a França, a Alemanha e a Itália, para substituir dentes perdidos, fixando-se aos dentes adjacentes com arcos de ouro ou de prata (2, 8).

Durante o século XVIII foi observado enorme progresso, na medicina dentária. Pierre Fauchard, famoso médico francês, descreveu os materiais e as práticas dentárias, existentes na época, no seu livro *Le Chirurgien Dentiste*, publicado em 1728, e onde, pela primeira vez, se define a medicina dentária como uma verdadeira profissão (9).

Estas preocupações, com a resolução de problemas da boca, foram-se traduzindo na procura de novos e melhores materiais dentários. Estes sofreram uma constante evolução e, cada um deles, na sua época, desempenhou um papel importante, contribuindo para que hoje, os materiais disponíveis, na prática clínica, se apresentem com elevados índices de qualidade. Esta evolução, embora lenta, tem sido consistente, ao longo dos séculos, verificando-se que, à medida que a medicina dentária e os tratamentos se vão tornando mais complexos, assim também o vão sendo os materiais (8, 10). Naturalmente essa evolução tem sido fortemente influenciada pelas exigências crescentes dos pacientes. Quanto mais desdentado for o paciente, mais difícil se torna a sua reabilitação, com recurso à medicina dentária tradicional, sendo necessário enveredar por tratamentos mais elaborados.

É neste contexto que a implantologia desempenha um papel primordial, permitindo a reabilitação de perdas dentárias extensas e complexas, com melhores resultados, estéticos e funcionais, contrariamente ao que ocorria até há alguns anos atrás (11-14).

Nos anos mais recentes, tem-se verificado um aumento muito significativo do número de casos reabilitados com recurso a implantes dentários (15). Actualmente, a implantologia oral é, provavelmente, a área da medicina dentária que mais tem evoluído e de forma mais rápida. Na realidade, a substituição, com sucesso, de dentes naturais perdidos, utilizando implantes dentários osteointegrados, constitui um dos maiores avanços ocorrido na medicina dentária, de todos os tempos.

A necessidade e o aumento do número de reabilitações orais com recurso a implantes dentários surge devido a um conjunto de factores, dos quais se destacam (15):

- aumento da esperança média de vida das populações;
- maior grau de exigência e procura de qualidade de vida, por parte dos pacientes;
- alterações anatómicas em consequência do edentulismo;
- desempenho insatisfatório das próteses removíveis, particularmente nos casos de reabsorção óssea extrema;
- aspectos psicológicos negativos associados à perda dentária;
- melhoria nos resultados, a longo prazo, das reabilitações orais com recurso a implantes e,
- vantagens das próteses implantosuportadas em relação às próteses tradicionais.

Nos próximos anos, como consequência do aumento da esperança e da qualidade de vida das populações, da melhoria crescente dos materiais utilizados e das taxas de sucesso das reabilitações orais com recurso a implantes, é previsível um aumento, ainda mais significativo, na procura deste tipo de tratamentos (16).

Na reabilitação de pacientes, total ou parcialmente desdentados, os implantes endoósseos tornaram-se os mais comumente utilizados (15, 17). Dois dos aspectos críticos determinantes do seu sucesso, a longo prazo, são a sua macro e microtopografia (18-23) já que, o material actualmente mais utilizado na sua confecção, o titânio comercialmente puro, pelas suas qualidades de biocompatibilidade e resistência, fornece fortes garantias de êxito (21, 24-27). É importante a constante busca de novos implantes, com novos desenhos e novas características, bem como o desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas, mais atraumáticas, que visem o aumento do sucesso clínico e a maior previsibilidade deste tipo de reabilitações dentárias. Na realidade, procura-se melhorar e acelerar o processo de osteointegração, entre outros aspectos, por optimização da superfície dos implantes, já que a resposta biológica e o prognóstico, destes tratamentos, é largamente dependente das suas características (22, 28-33). Uma das formas de o

conseguir é através do tratamento das superfícies, com recurso a diferentes procedimentos (34).

São várias as técnicas de tratamento de superfície a que podem ser sujeitos os implantes, podendo ser agrupados em dois grandes grupos; os que apresentam superfície modificada por métodos de adição e os preparados por métodos de subtracção de material (34, 35). Para além da melhoria das características, algumas técnicas procuram tornar a superfície do titânio bioactiva (33, 34, 36). Uma das formas de o conseguir é recorrendo ao revestimento da superfície com substâncias do tipo fosfato de cálcio que, devido às suas características e semelhanças com o tecido ósseo, apresenta vantagens, nomeadamente ao proporcionar uma melhor e mais rápida ancoragem ao osso (20, 36-39).

O modo como os implantes se fixam ao tecido ósseo, alcançando a necessária osteointegração, depende de vários factores. Albrektsson e colaboradores (21) enumeraram os factores, ainda hoje largamente aceites pela comunidade clínica internacional, necessários ao desenvolvimento de uma boa osteointegração:

- 1) biocompatibilidade do material;
- 2) desenho e qualidade da superfície do implante;
- 3) características do hospedeiro nomeadamente a quantidade e a qualidade do osso disponível;
- 4) técnica cirúrgica e,
- 5) a carga a que serão sujeitos os implantes.

Destes, os dois primeiros estão directamente relacionados com o implante. O sucesso é assim dependente de três variáveis: o implante, o hospedeiro e o cirurgião.

Como resultado de constantes estudos e investigações em relação ao desenho dos implantes, às suas características topográficas e de composição química, bem como, ao plano de tratamento e à técnica cirúrgica, os resultados clínicos das reabilitações orais com recurso a implantes, são agora mais previsíveis, sendo as taxas de sucesso mais elevadas (23, 40). Estas traduzem-se basicamente, no aumento do tempo médio de vida dos implantes, mantidos em função. Hoje em dia, osteointegração é *quase* sinónimo de sucesso clínico (41).

Apesar de só nos últimos anos a implantologia ter adquirido a notoriedade e o prestígio que possui actualmente, a verdade é que a sua história data de há milhares de anos e inclui as antigas civilizações Chinesa, há cerca de 4000 anos, os antigos Egípcios, há cerca de 2000 anos, e as civilizações pré-colombianas, há cerca de 1500 anos (2). O

implante aloplástico endoósseo, mais antigo, alguma vez encontrado, data do ano 600 d.C., consistindo na implantação, na zona incisiva de uma mandíbula de origem Maia, de três fragmentos de madrepérola da concha de um molusco. Pelo exame radiográfico concluiu-se que os fragmentos, devido à calcificação óssea observada em torno deles, haviam sido implantados em vida (2). Existem outras provas que confirmam terem sido realizadas implantações dentárias noutras culturas, tais como a Inca, Azteca, Hebraica, Etrusca, Fenícia, Grega e Romana (2, 7).

Os primeiros princípios científicos para a realização de transplantes e implantes dentários foram descritos por Albucassis, cirurgião árabe, da Idade Média (2, 4).

A história da implantologia é riquíssima. Tem sido feita de avanços progressivos, resultando, grande parte dos princípios actualmente aceites como correctos, de descobertas verificadas principalmente a partir do Séc. XIX, muitas vezes feitas de forma ocasional (42). Desde que, no início do século XIX, Maggiolo, introduziu o conceito de implante dentário, ao confeccionar aquilo que é hoje, considerado um dos primeiros implantes endoósseos, a implantologia, como arte dentária, não mais parou de evoluir. Em 1913, Greenfield, em Boston, Massachusetts, descreveu o que podem ser consideradas as bases da implantologia moderna falando, pela primeira vez, na necessidade de aguardar tempo suficiente para que se verificasse a cicatrização do osso em torno de um implante (42). Em 1915, Congdon (43) descrevia, pela primeira vez, o fenómeno da implantação, como sendo a intervenção que visava colocar um material natural ou artificial, num alvéolo preparado no osso, com vista a substituir um dente perdido. Contudo, é a partir de 1952 que a implantologia sofre o grande impulso com Brånemark e a sua equipa. Nesse ano iniciaram-se, na Suécia, estudos experimentais sobre a importância da micro-circulação na cicatrização da medula óssea. Os primeiros resultados foram publicados em 1977 (44). Apesar de, inicialmente, estes estudos, nada terem a ver com a implantologia oral, as suas conclusões vieram marcá-la profundamente. Pode mesmo considerar-se uma fase pré e outra pós Brånemark. Com este investigador é introduzido o termo osteointegração e o titânio comercialmente puro e as suas ligas passaram a constituir, definitivamente, os materiais de eleição na confecção dos implantes dentários (21). Já em 1940, Bothe e colaboradores concluíam que a resposta do osso ao titânio era tão boa senão melhor do que a que se observava com ligas não corrosivas, “havendo mesmo uma maior tendência para a sua *fusão* com o osso” (42). Os bons resultados da investigação experimental e clínica têm contribuído para o aumento e a generalização do seu uso, em medicina dentária, com numerosos estudos que confirmam o seu sucesso clínico (45-49). Para além das suas excelentes propriedades mecânicas, o titânio apresenta ainda, uma excelente biocompatibilidade que, em grande parte, se fica a dever ao facto de, quando em contacto com o oxigénio, devido à sua elevada reactividade, se formar espontaneamente, à superfície, uma camada de óxidos,

estável, que o protege da corrosão e dos ataques químicos, inclusivamente dos provenientes dos fluidos corporais (21, 24, 25).

Durante décadas, assistiu-se a um grande desenvolvimento ao nível da forma dos implantes e dos materiais com que são confeccionados. O século XX trouxe, para a implantologia, as bases e os fundamentos científicos, que não existiam noutras épocas.

É assim, pacificamente aceite que, apesar de uma história longa, o verdadeiro impulso da implantologia surge com os estudos de P-I Brånemark e com o estabelecimento do conceito de osteointegração. Desde esse momento, a colocação de implantes dentários passou a desempenhar um papel primordial na medicina dentária, influenciando fortemente a sua prática clínica. Se até à década de oitenta, do século passado, não constituía prática corrente na generalidade dos consultórios dentários, hoje, no final da primeira década do século XXI, os implantes dentários tornaram-se o tratamento de eleição em grande parte das reabilitações orais (23). Contudo, apesar de todos os aspectos positivos que lhe estão associados, não deixam de continuar a apresentar potenciais problemas; nem todos os implantes osteointegram e nem todos eles sobrevivem, em função mastigatória, a longo prazo (41). A sua perda comporta custos elevados, directos e indirectos, quer em termos de tempo de cadeira quer em termos de custo dos materiais utilizados. Por outro lado, a não integração de um implante pode ser problemática uma vez que pode originar uma zona desdentada mais difícil de reabilitar do que a anterior.

A colocação de implantes exige um estudo meticoloso dos casos, incluindo a análise de factores locais e sistémicos do hospedeiro, bem como do desenho da prótese.

Os critérios de sucesso, aplicados em implantologia, são complexos. Geralmente considera-se o sucesso associado à sobrevida do implante e o insucesso à sua perda. Vários autores têm proposto critérios de sucesso. Albrektsson e colaboradores (50), em 1986, definiram critérios que ainda hoje são largamente aceites:

- 1) imobilidade do implante unitário quando testado clinicamente;
- 2) ausência de qualquer evidência de radiolucência peri-implantar;
- 3) perda óssea vertical anual, inferior a 0,2 mm, após o primeiro ano, em função;
- 4) ausência de sinais e sintomas persistentes e/ou irreversíveis, como dor, infecção, neuropatia, parestesia ou violação do canal mandibular, quando em função,
- 5) sobrevida de 85% aos 5 anos e 80% aos 10 anos.

Smith e Zarb (51), em 1989, atribuíram um sentido mais clínico a esses critérios, sugerindo, como sendo igualmente importantes, o conforto do paciente, a profundidade

do sulco, a condição gengival e a ausência de dano causado nos dentes adjacentes, no seio maxilar, no canal radicular ou no soalho da cavidade nasal.

Desde o momento histórico da colocação do primeiro implante que os implantologistas e a indústria implantológica têm procurado compreender os mecanismos inerentes à formação e crescimento ósseo e à influência que as superfícies podem desempenhar neste fenómeno. Hoje é consensualmente aceite que, entre outros factores, o tipo de superfície implantar desempenha um papel chave no sucesso da osteointegração (21, 29, 32, 52, 53). Schroeder e colaboradores relataram, pela primeira vez, nos finais da década de setenta, a importância de superfícies rugosas no processo de osteointegração (42). Há hoje, vários estudos referindo que superfícies moderadamente rugosas resultam numa melhor interface osso-implante, proporcionando uma integração mais rápida e mais firme do que a observada com superfícies muito rugosas ou muito lisas (41, 54-57). De facto, modificando a microtopografia do implante pode-se conseguir uma melhor ligação mecânica ao tecido ósseo (55), ao mesmo tempo que se procura limitar a formação de tecido fibroso, altamente negativa, pois pode conduzir ao seu encapsulamento, ao estabelecimento de peri-implantite e à sua conseqüente perda. Esta situação conduz, inevitavelmente, ao fracasso. Continua-se contudo, apesar desta certeza, a não se saber, tal como refere uma das mais consagradas investigadoras nesta área, a Professora Ann Wennerberg, da Suécia, qual o valor de rugosidade considerado ideal (58). Hoje em dia, já se fala mesmo em nanorugosidade (33, 41, 59, 60), acreditando-se que a nanotopografia, para além da microtopografia, desempenha um papel importante, particularmente nas primeiras fases da osteointegração, potenciando-a, por aumento da área de contacto ósseo (59).

A implantologia oral sofreu uma evolução muito rápida e acentuada, nos últimos cinquenta anos, quando comparada com a evolução observada em outras áreas da medicina dentária. Durante este período, verificou-se que, quando a macro e a microtopografia dos implantes são correctas, e quando as cargas que sobre eles incidem não são lesivas, por norma, o resultado será uma osteointegração duradoura (16, 21, 61), ocorrendo sempre, sob o ponto de vista prático, a formação de osso e medula óssea com, mais ou menos tecido fibroso interposto.

Desta forma, e sempre em busca do Graal dos implantes dentários, a investigação prossegue no sentido de alcançar os melhores tamanhos, formas e superfícies. Desta maneira, procuram-se obter superiores resultados de osteointegração, mais duradouros e, fundamentalmente, alcançados de forma mais rápida. Implantes com novas superfícies e desenhos têm vindo a ser produzidos e comercializados a um ritmo elevado (62).

A investigação, que no início se centrava essencialmente na macroestrutura dos implantes passou a concentrar-se na sua microestrutura, começando agora a orientar-se,

cada vez mais, no sentido da nanoestrutura e na percepção dos fenómenos que ocorrem ao nível atómico e molecular. Procura-se compreender e, eventualmente, influenciar os fenómenos iniciais que se observam antes de se chegar às fases celular e tecidual. Aspectos como a adsorção de biomoléculas à superfície e a influência da micro e nanoestrutura na expressão de genes reguladores da osteogénese ganham, assim, terreno na investigação actual que privilegia e se centra, cada vez mais, nas superfícies implantares. Tudo isto, procurando sempre responder aos desafios crescentes da implantologia moderna que exige reabilitações mais complexas, em zonas menos favoráveis e, muitas vezes, com recurso a implantes de dimensões cada vez menores. Tenta-se, assim, determinar o compromisso ideal entre a macro, micro e nanotopografia dos implantes e uma maior estabilidade primária, com melhores respostas biológicas para, posteriormente, se alcançarem melhores estabilidades secundárias e, conseqüentemente, maiores taxas de sucesso clínico.

Independentemente das suas características, um bom implante será sempre aquele que apresenta boa capacidade de adesão ao tecido ósseo envolvente e características mecânicas capazes de suportarem as cargas que sobre ele incidem. Deve igualmente, substituir, de forma eficaz e agradável, os tecidos e dentes perdidos.

Presentemente, apesar de existir muita investigação, nesta área, ainda muito há a compreender e a fazer. Existe alguma controvérsia causada pelo facto de a osteointegração ser um conceito biológico, de observação histológica, e o sucesso das terapêuticas que recorrem ao uso de implantes se basearem em critérios clínicos e radiográficos (32, 63, 64). A um sucesso clínico pode não corresponder a mesma taxa de osteointegração quando considerada a percentagem alcançada, de contacto entre o osso e o implante. Esse sucesso pode também corresponder a diferentes graus de adesão, proliferação e diferenciação celular. Simultaneamente, em consequência da pressão económica constante, verifica-se que as marcas comerciais mantêm elevados níveis de procura de novos desenhos e novas superfícies, sendo lançadas numerosas soluções no mercado, muitas vezes concorrendo com implantes de comprovado sucesso clínico e histológico, da mesma proveniência (40, 62). Lamentavelmente, muitas vezes, os novos implantes dentários são introduzidos na prática clínica sem suporte científico adequado, baseado em estudos laboratoriais e clínicos, realizados previamente (40, 41, 61), nomeadamente, estudos longitudinais que comprovem o seu sucesso clínico, a longo prazo (62, 65). O que começou por ser regido por protocolos cuidadosos, dominados pela investigação científica e clínica, rapidamente foi substituído por uma atitude mais industrial do tipo “produção em série” (41).

A experimentação *in vitro*, que representa uma fase muito importante da investigação, pode conduzir a resultados contraditórios ou mesmo, não totalmente

comparáveis (66). A resposta das células aos materiais depende do tipo de culturas celulares utilizadas, do grau de maturação dessas células e das condições experimentais que podem conduzir a resultados diferentes com metodologias semelhantes (29). Por outro lado, muita dessa investigação utiliza amostras de superfícies produzidas industrialmente ou em laboratório, que não reflectem totalmente as superfícies produzidas comercialmente, embora criem condições mais favoráveis à experimentação laboratorial. Muita dela nem sequer toma em consideração a topografia de superfície dos implantes nem mesmo a sua composição química. Para além disso, existe alguma confusão relativamente às superfícies, nomeadamente em relação aos tipos de tratamento. Muitas vezes identificam-se superfícies pelo tipo de tratamento a que foram submetidas não tendo em conta que podem conduzir a diferentes microtopografias e, conseqüentemente, a distintas propriedades, susceptíveis de induzir comportamentos biológicos variados. Para além destes aspectos, que dizem respeito ao próprio implante, não podemos menosprezar um outro factor, considerado muito importante por Albretsson (41), em 2000, quando questionou se a habilidade cirúrgica do profissional não seria mais importante, para o sucesso clínico das reabilitações implantares, do que todas as modificações conseguidas ao nível da macro e microestrutura dos implantes. A investigação, nesta área, suscita assim, ainda várias dúvidas para as quais linhas de investigação futuras poderão seguramente trazer novas respostas.

São assim necessários mais estudos, *in vitro* e *in vivo*, com maior reprodutibilidade clínica, utilizando implantes com diferentes tipos de superfície para compreender um fenómeno complexo e que continua, ainda hoje, a suscitar inúmeras dúvidas: o fenómeno da osteointegração.

Sendo assim, e no seguimento do anteriormente exposto, o objectivo global deste trabalho, realizado em condições experimentais *in vitro*, foi o de procurar compreender a influência que a macroestrutura e as características topográficas e químicas dos implantes podem ter no comportamento das células osteoblásticas nomeadamente ao nível da sua adesão, proliferação, diferenciação e actividade.

Com o objectivo de recriar, o melhor possível, as condições observadas na prática clínica, foram utilizados implantes com características idênticas às que apresentam os implantes na sua forma comercial e células osteoblásticas de origem humana.

O estudo envolveu a utilização de seis grupos de implantes com superfícies diferentes e, mais concretamente, pretendeu-se responder às seguintes questões:

- Poderemos esperar que implantes submetidos a tratamentos de superfície, designados da mesma forma, apresentem comportamentos biológicos semelhantes, *in vitro*?

- Será suficiente seleccionar os implantes para utilização na prática clínica, pelo tipo de tratamento de superfície a que foram submetidos?

Para isso procuramos:

- Avaliar qualitativamente o comportamento biológico de células osteoblásticas na presença de diferentes superfícies de implantes.

- Avaliar quantitativamente o comportamento biológico de células osteoblásticas na presença de diferentes superfícies de implantes, com base na avaliação da actividade da fosfatase alcalina e no consumo de cálcio ionizado presente no meio de cultura.

- Analisar as diferenças observadas no comportamento biológico das células osteoblásticas, com base nas variações existentes ao nível da microtopografia, da rugosidade e da composição química das superfícies utilizadas.

Não constitui objectivo deste trabalho determinar qual a melhor superfície das seis analisadas. Mais importante do que saber qual a melhor, foi verificar e perceber se superfícies, que em termos teóricos se classificam como iguais podem induzir respostas biológicas diferentes, em condições experimentais *in vitro*.

Este trabalho de investigação constituiu a primeira parte de um projecto global, mais abrangente, que se pretende continuar, numa segunda fase, com a análise do comportamento biológico, destes mesmos seis grupos de implantes, em condições experimentais *in vivo*.

INTRODUÇÃO

1. IMPLANTES DENTÁRIOS

Ao longo dos tempos, os implantes têm apresentado várias evoluções ao nível do desenho, do material com que são confeccionados e das suas características, nomeadamente as da superfície (62). Hoje em dia, são inúmeros os tipos de implantes em comercialização, com diferentes características físicas, mecânicas e químicas, sendo utilizados em cada vez maior número de situações clínicas, com indicações cada vez mais extensas e com resultados percentuais de sucesso clínico, globalmente, mais elevados (62, 64, 67, 68). Apesar disso, as diferentes marcas comerciais continuam a procurar novas soluções e a investigação prossegue com vista a proporcionar novos desenhos e conceitos que permitam alcançar a melhor resposta biológica, o mais rapidamente possível (41). Procura-se assim, reduzir os tempos de espera a observar, até ser possível submeter os implantes às cargas mastigatórias.

Sob o ponto de vista biomecânico os implantes comportam-se de forma diferente relativamente aos dentes naturais já que, contrariamente ao que se observa com estes, estão ancorados ao osso, de forma rígida, numa fixação do tipo anquilose. Nos dentes, a interposição de um tecido conjuntivo fibroso, o ligamento periodontal, confere elasticidade à sua fixação ao osso circundante (69, 70).

A topografia da superfície, ao nível micrométrico, constituindo a chamada microtopografia do implante, tem sido considerada, na última década, como o factor mais importante para o sucesso da osteointegração (33, 60). Corresponde às características de superfície, propriamente ditas, e delas depende, directamente, a interacção célula-implante, sendo importante para a obtenção de uma estabilidade secundária duradoura. Para além desta, também é importante considerar a macrotopografia do implante, que corresponde à sua forma ou desenho e que está fortemente relacionada com a transmissão das forças e tensões ao osso adjacente, sendo importante no alcance da estabilidade primária (71), tão necessária ao sucesso clínico. Presentemente, para além destes dois factores, começa também a considerar-se importante o nível nanométrico, constituindo a chamada nanotopografia, embora a verdadeira dimensão da sua importância, ainda permaneça por comprovar (33, 41, 59, 60). Provavelmente desempenha um papel importante nas fases iniciais, nomeadamente na adsorção de água, macromoléculas e proteínas, à superfície do implante, potenciando a integração do

implante ao osso, com um aumento, de até 40%, da superfície de contacto com o osso, conforme é referido por Ogawa e colaboradores (59).

Todos estes três parâmetros; macro, micro e nanométrico, estão fortemente interligados já que, é impossível actuar num, sem se alterarem os outros (33, 41, 60).

A topografia de superfície desempenha um papel crítico na interacção dos implantes com os tecidos adjacentes, influenciando muitas das mais importantes etapas que constituem a cascata de acontecimentos observados aquando da cicatrização dos tecidos peri-implantares (22, 34).

1.1. Tipo de implantes

Quanto à localização ou posicionamento que apresentam em relação ao osso, podem ser classificados em sub-periósseos ou justa-ósseos, endoósseos e trans-ósseos (70, 72, 73).

Os implantes sub-periósseos são aplicados directamente sobre o osso, assentes sobre a estrutura óssea, sem ocorrer perfuração (7). Após exposição do local a implantar, mediante a realização de um retalho de espessura total, é feito um molde directo da estrutura óssea, sendo os implantes confeccionados à sua medida. Ficam recobertos por periósseo e mucosa, daí a sua designação (73). Os implantes endoósseos são inseridos no rebordo ósseo desdentado, da maxila ou mandíbula, através de uma incisão intra-oral realizada na zona muco-perióssea (7, 74). O termo endoósseo significa literalmente “dentro do osso” (73). Os implantes trans-ósseos, tal como os endoósseos, são inseridos no osso, concretamente na mandíbula, com a particularidade de penetrarem a totalidade da sua espessura, sendo inseridos pelo bordo inferior e saindo pelo bordo superior, onde se fixam as estruturas protéticas (72, 73).

1.2. Características dos implantes

Vários factores desempenham um papel importante para o sucesso da osteointegração, nomeadamente as características da superfície dos implantes, quer físicas quer químicas, já que as reacções que se observam durante a osteointegração, ocorrem nessa zona (75). Na realidade, as células só contactam com a superfície do implante. São assim importantes, para esse sucesso, aspectos como a composição química, a rugosidade, a orientação das irregularidades, o potencial de dissolução e

degradação dos materiais, a libertação de iões para os tecidos adjacentes, a molhabilidade, a energia e a carga da superfície (76). Estas características condicionam e determinam a resposta biológica e as reacções tecidulares, modelando a osteogénese (29, 77). Rugosidade e composição química têm sido das características dos implantes, mais investigadas (25, 33, 78).

Os implantes podem ser caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas, topográficas e físico-químicas (33), estando todas elas fortemente interligadas, já que modificando uma delas, as restantes também sofrem alterações (33, 77).

1.2.1. Propriedades mecânicas

A natureza optimiza todos os sistemas biológicos, onde se incluem as estruturas ósseas, sempre numa dupla perspectiva: a biológica e a biomecânica. Estes dois princípios têm igualmente de estar presentes no desenho e fabrico de implantes dentários que têm de ser vistos sempre, numa perspectiva biológica, capaz de garantir a osteointegração, e numa perspectiva biomecânica, proporcionando a resistência necessária às cargas que sobre eles são aplicadas e a consequente capacidade de as transmitir ao osso envolvente (79). As características mecânicas desempenham assim, um papel fundamental, não tanto numa perspectiva de osteointegração mas mais, em relação à manutenção dos sistemas, a longo prazo.

Neste grupo de características incluem-se o módulo de elasticidade, o coeficiente de alongamento, a dureza, a resistência à tracção, a densidade, o ponto de fusão dos materiais, (17), o desenho do implante, das espiras e das conexões, entre outras (79). Estão relacionadas com a macroestrutura ou desenho dos implantes e com as propriedades dos materiais com que são confeccionados. Destas características depende a forma como os implantes reagem à aplicação de forças, a maneira como as transmitem ao osso circundante e o modo como resistem a fenómenos negativos como a corrosão, o desgaste e a fadiga dos materiais que, de entre outras coisas, podem conduzir à libertação de iões para o meio biológico envolvente, comprometendo a resposta dos tecidos (33, 76).

Conforme refere Hansson (79), conhecendo a geometria ou desenho do implante, as propriedades dos materiais com que é confeccionado e as cargas que sobre ele incidem, podem ser calculadas as trajectórias de dispersão das forças através de sistemas matemáticos.

1.2.1.1. Macroestrutura, forma e desenho dos implantes

Os implantes endoósseos são os implantes dentários mais utilizados, na actualidade (15, 17). Podem ser classificados em vários sub-grupos, de acordo com o seu desenho ou forma, com a existência ou não de espiras, com o tipo de extremidade apical, que pode ser cortante ou não, com a consistência da sua estrutura, que pode ser compacta ou não e finalmente, com o tipo de tratamento de superfície a que foram submetidos (62).

Quando se fala em desenho ou forma de um implante endoósseo, habitualmente está-se a referir ao desenho da porção intra-óssea, embora o desenho da conexão e dos pilares de prótese também sejam importantes para a reabilitação. O desenho da parte intra-óssea é crucial no estabelecimento da estabilidade primária e, posteriormente, da estabilidade secundária, já que é a zona que vai contactar directamente com o osso e que vai ser responsável pela transmissão das forças que incidem sobre eles (71).

Habitualmente, e por questões meramente comerciais, cada uma das grandes marcas, apresenta o seu próprio desenho de implante, sendo as maiores diferenças observadas ao nível da conexão e da parte protética (62). Quanto à parte intra-óssea, presentemente, as semelhanças são mais evidentes (71). Macroscopicamente, os implantes dividem-se nos que têm, grosseiramente, a forma dos alvéolos dentários e que, por isso, apresentam uma forma cónica, e os cilíndricos. Apesar de estas serem as formas mais utilizadas presentemente, não se pode deixar de referir que outros formatos estão ou estiveram presentes no mercado, como sejam implantes em forma de agulha, lâmina, disco, cesta ou gaiola, entre outros (17, 62). Quanto à textura da superfície, podem apresentar uma superfície lisa, sendo impactados no osso, ou apresentar espiras, sendo, nestes casos, rosqueáveis, do tipo parafuso. Podem apresentar a extremidade apical cortante ou não e podem ter uma estrutura compacta ou serem ocos, com orifícios, permitindo, neste caso, o crescimento ósseo através dos orifícios. A presença de espiras ou de orifícios visa o aumento da área de contacto com o osso, proporcionando uma maior estabilidade, devido ao efeito adicional de retenção mecânica. Ao nível das espiras, os implantes podem apresentar diferenças, mais ou menos significativas, quanto ao seu número, à sua profundidade (distância topo-fundo), ao afastamento entre si, bem como em relação ao ângulo formado pelas vertentes (62).

A geometria dos implantes tem influência na obtenção da estabilidade inicial, na sua evolução e influencia a sobrevivência dos implantes (80).

Os implantes mais utilizados actualmente são os cónicos e os cilíndricos, do tipo parafuso, rosqueáveis e compactos (41).

Outros aspectos importantes a considerar nos implantes, relacionados com a sua macroestrutura, são o comprimento e o diâmetro.

1.2.1.2. Comprimento dos implantes

O comprimento dos implantes disponíveis no mercado, varia entre os 6 mm, os mais curtos, e os 20 mm, os mais compridos (71, 81). Os mais frequentemente utilizados situam-se entre os 10 e os 15 mm (74). Estes valores estão em sintonia com a dimensão média das raízes dentárias (82). A principal vantagem do comprimento dos implantes é que, quanto maior ele for, maior é a área de contacto com o tecido ósseo, com maior probabilidade de obtenção da desejada osteointegração. Outra das vantagens dos implantes mais compridos é poderem alcançar as corticais ósseas, no sentido vertical, aumentando a fixação ao osso (71).

Outro dos aspectos importantes na selecção do comprimento dos implantes, numa perspectiva biomecânica, é a proporção entre o implante e a coroa dentária que tem de ser favorável à resistência às cargas mastigatórias, evitando excessiva concentração de forças na zona cervical e na zona intermédia do implante, o que poderia levar à sua fractura (81).

1.2.1.3. Diâmetro dos implantes

Os implantes apresentam diâmetros, ao nível da sua zona cervical, compreendidos entre os 2,0 mm e os 6,5 mm. Estes valores estão em sintonia com o diâmetro dos dentes humanos, igualmente ao nível da sua zona cervical. Desta forma procura-se proporcionar um bom perfil de emergência das coroas a confeccionar sobre os implantes, e uma harmoniosa relação com os tecidos moles (81, 82). Diâmetros de, pelo menos, 3,25 mm são recomendados para conferirem simultaneamente, uma resistência adequada do implante aos esforços mastigatórios (71).

Duas das vantagens dos implantes de maior diâmetro são o facto de proporcionarem maior área de contacto com o tecido ósseo e serem mais resistentes. Favorecem a osteointegração e a transmissão de forças ao osso circundante e resistem melhor às cargas que sobre eles incidem (62, 71). Outra vantagem destes implantes, é o facto de poderem alcançar as corticais ósseas, no sentido horizontal, aumentando a sua fixação e estabilidade primária (71). A sua utilização é, no entanto, mais restrita porque osso com dimensões significativas, no sentido da largura, não é tão comum, além de que a técnica operatória, ao envolver brocas de diâmetros maiores, por vezes desproporcionados em relação à anatomia do rebordo alveolar, torna-se mais exigente e mais arriscada.

Caramês (80), no seu trabalho de doutoramento, observou uma tendência para uma maior estabilidade inicial em implantes de maior diâmetro e menor comprimento, comparativamente com implantes de menor diâmetro e maior comprimento. Verificou contudo, uma percentagem de sobrevivência menor para os primeiros.

1.2.2. Propriedades topográficas

As características topográficas dos implantes referem-se à rugosidade da superfície e à orientação das irregularidades (33).

A rugosidade é uma das características dos implantes dentários que mais tem sido estudada (33). Desempenha um papel importante já que, com o seu incremento, se consegue aumentar consideravelmente, a superfície dos implantes e, desta forma, a área de contacto com o tecido ósseo (83).

Diferentes graus de rugosidade podem ser conseguidos através de variadas técnicas, presentemente, bem conhecidas, comercialmente exploradas e extensamente documentadas (34). Modificando esta característica é possível influenciar a resposta biológica, tanto ao nível molecular como celular (84).

Superfícies moderadamente rugosas são mais favoráveis ao processo da osteointegração (21, 33, 41, 61, 78), embora não se saiba ainda, qual a rugosidade considerada ideal (58). Superfícies com rugosidade extrema, quer baixa quer elevada (78), estão associadas, habitualmente, a respostas osteoblásticas menos marcadas (33). Para rugosidades excessivas, os osteoblastos, ao não conseguirem efectuar uma correcta expansão citoplasmática, não alcançam as irregularidades, comportando-se como se de uma superfície lisa se tratasse (29). Para além disso, estas superfícies, muito rugosas, estão habitualmente, associadas a mais problemas peri-implantares (51) e a um maior risco de dissolução e libertação de iões para os tecidos adjacentes (33). Actualmente, a grande maioria dos implantes dentários, em comercialização, têm superfícies moderadamente rugosas (41).

A rugosidade dos implantes não é igual em todas as suas zonas. Habitualmente, os topos são mais rugosos do que as vertentes e, por sua vez, estas são mais rugosas do que os fundos (54).

Tendo em conta os conhecimentos actuais, os implantes podem ser agrupados, quanto à sua rugosidade média (R_a), em quatro grupos: lisos, minimamente rugosos, moderadamente rugosos e muito rugosos, conforme se pode observar na Tabela 2.1 (60):

TEXTURA DO IMPLANTE	R_a (Rugosidade média)
Lisos	< 0,5 μm
Minimamente rugosos	Entre 0,5 e 1,0 μm
Moderadamente rugosos	Entre 1,0 e 2,0 μm
Muito rugosos	> 2,0 μm

Tabela 2. 1 – Classificação dos implantes, de acordo com a sua rugosidade média (R_a).

Contudo, não existe consenso relativamente a esta distribuição, podendo os implantes num estudo, ser considerados moderadamente rugosos e noutro, com o mesmo R_a , ser classificados como pouco rugosos (54).

Quanto à orientação das irregularidades, as superfícies dos implantes podem ser classificadas em isotrópicas ou anisotrópicas (85). As primeiras apresentam a mesma topografia independentemente da direcção em que é efectuada a análise, isto é, sendo irregulares, não apresentam uma orientação específica e definida das irregularidades. É o caso da superfície dos implantes submetidos a jactamento e/ou ataque ácido ou a bombardeamento por *spray* de plasma de titânio (54). As segundas apresentam uma orientação das irregularidades bem definida, diferindo a sua rugosidade em função da direcção em que é efectuada a análise. É o caso dos implantes maquinados (54). As figuras 2.1 e 2.2 mostram uma superfície maquinada, anisotrópica, e uma superfície isotrópica, submetida a jactamento e ataque ácido, respectivamente.

A orientação das irregularidades é importante porque o padrão de crescimento que as células adoptam em relação à superfície dos implantes, é influenciado por ela (60, 86, 87).

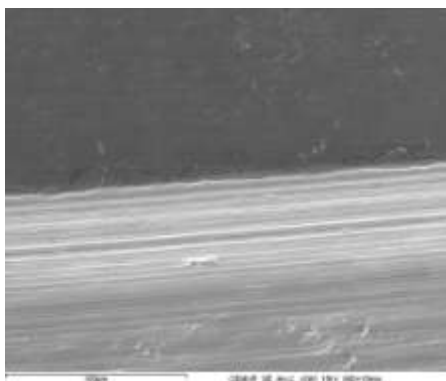


Figura 2.1 – Superfície anisotrópica.

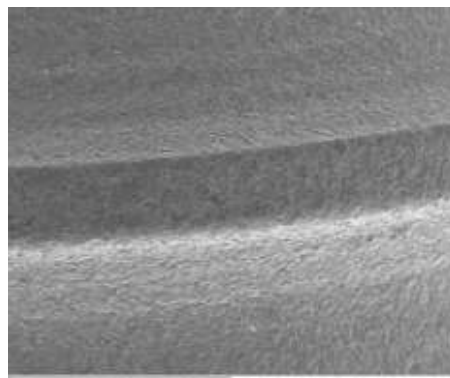


Figura 2.2 – Superfície isotrópica.

1.2.3. Propriedades físico-químicas

1.2.3.1. Características físicas

Neste grupo de características incluem-se aspectos como a energia e a carga de superfície e a molhabilidade.

A energia de superfície reflecte o grau de ligações livres ou por preencher, existentes à superfície dos materiais. Essas ligações encontram-se disponíveis para estabelecerem pontes com outras estruturas ou materiais (24, 33). Quando o material é colocado em contacto com um meio reactivo, como por exemplo, o ar, a água ou um meio biológico, imediatamente se estabelecem ligações entre os componentes atómicos de ambos os sistemas, com a consequente diminuição da energia de superfície do material (24). Esta reactividade dos materiais constitui uma das razões pela qual a composição química da superfície é habitualmente diferente da do núcleo (24, 88, 89).

Materiais com energia de superfície elevada têm, pelo menos em teoria, maior capacidade para se ligarem a outras estruturas, como por exemplo às proteínas plasmáticas (33, 90). A energia de superfície do titânio é elevada favorecendo a adsorção de moléculas e proteínas. Porém, este é também o motivo pelo qual os implantes em titânio apresentam uma elevada afinidade para contaminantes, como por exemplo os hidrocarbonetos e carbonetos, presentes no meio ambiente que, ao ligarem-se à superfície, diminuem a sua energia de ligação (90).

Todos os sólidos, incluindo os implantes dentários, apresentam uma carga de superfície que pode ser positiva, neutra ou negativa. Este aspecto está relacionado com o

facto de as suas superfícies conterem grupos funcionais, como por exemplo, os grupos hidroxilo, que têm carga eléctrica. É através destes grupos que se estabelecem as ligações com o meio envolvente, nomeadamente com as proteínas, que também têm carga eléctrica. O somatório das cargas eléctricas de todas as regiões de um implante, confere-lhe uma carga total (91).

A carga de uma superfície depende assim, da extensão da ionização dos grupos funcionais presentes.

Hamdan e colaboradores (91), num estudo recente, de 2006, verificaram que superfícies de titânio, com carga positiva, favoreceram, significativamente, a adesão celular.

A molhabilidade determina o grau de contacto do material com os fluidos envolventes e depende fortemente da carga de superfície. Corresponde à apetência de um sólido por líquidos. É uma característica importante já que, a uma maior molhabilidade corresponde uma maior interacção do material com o meio biológico envolvente (25). Superfícies com elevada molhabilidade são habitualmente hidrofílicas (90).

O cálculo do ângulo de contacto de um material é uma forma prática de determinar a energia de superfície e a molhabilidade do material (figura 2.3).

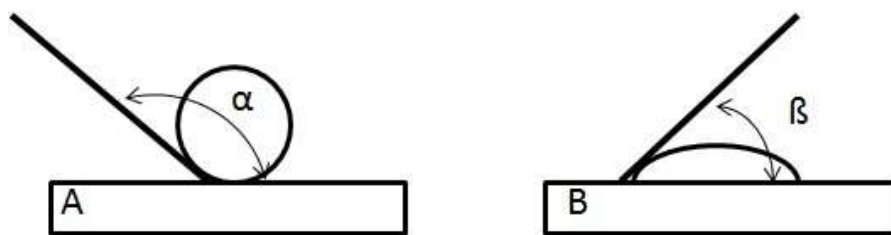


Figura 2.3 – Ângulo de contacto. A – ângulo elevado – material hidrofóbico.
B – ângulo baixo – material hidrofílico.

Elevadas energias de superfície e molhabilidade, baixos ângulos de contacto e superfícies hidrofílicas são características que favorecem o fenómeno da osteointegração (61). Por este motivo, a superfície da maioria dos implantes é hidrofílica, apresentando baixos ângulos de contacto e uma elevada apetência pelos fluidos biológicos (92).

1.2.3.2. Características químicas

Actualmente, a generalidade dos implantes dentários são confeccionados em titânio comercialmente puro, com um grau de pureza superior a 99,75%, pelo que a composição química do núcleo é muito semelhante entre eles (61).

A composição química da superfície dos implantes é fortemente influenciada pelos métodos de fabrico nomeadamente, pelos tratamentos e acabamentos a que são submetidos (33). É extremamente sensível à contaminação exterior (93), razão pela qual é, habitualmente, muito diferente da composição química do núcleo do implante (24, 88, 89). Este é também o principal motivo pelo qual a composição química da superfície dos implantes não é igual em toda a sua extensão, variando de zona para zona, dentro de um mesmo implante. Também por esse motivo se podem observar diferenças, a este nível, entre implantes pertencentes ao mesmo lote. Desempenha um papel importante e crucial na osteointegração, pois dela depende o estabelecimento das ligações com o meio envolvente (60).

O núcleo dos implantes confeccionados em titânio comercialmente puro é formado essencialmente por titânio e, em menores quantidades, por outros elementos, como o carbono, ferro e oxigénio. De acordo com a percentagem destes dois últimos elementos, podem ser classificados em quatro graus. Os mais utilizados actualmente são os de grau III e IV, sendo o de grau IV o que apresenta maior percentagem de oxigénio (17). A tabela 2.2 mostra a percentagem relativa de ferro e oxigénio presente nos quatro graus de titânio comercialmente puro e numa liga de titânio-alumínio-vanádio. Pequenas diferenças nestes dois componentes podem influenciar grandemente as suas propriedades mecânicas e físicas (17, 61, 76).

		Fe	O
Titânio comercialmente puro	Grau I	0,02	0,18
	Grau II	0,03	0,25
	Grau III	0,03	0,35
	Grau IV	0,05	0,40
Liga de Ti ₆ Al ₄ V		0,25	0,13

Tabela 2.2 – Percentagem de ferro e oxigénio presente nos diferentes graus de titânio comercialmente puro e numa liga de titânio (% atómica).

A superfície é constituída maioritariamente por oxigénio e titânio formando, devido à elevada reactividade deste elemento, uma camada de óxido de titânio (24, 75). Outros elementos podem ser encontrados, tais como o carbono, o flúor, o silício, o azoto, o alumínio, o fósforo e o cálcio e reflectem, quase sempre, de alguma forma, um certo tipo de contaminação exterior, ocorrida durante o processo de fabrico do implante. Só em determinadas situações é que essa incorporação é intencional e visa promover a osteointegração (11, 94-98). Apesar de, geralmente, estarem presentes em pequenas concentrações, o facto de não se saber, concretamente, quais os seus efeitos na biocompatibilidade e na resposta biológica aconselha à redução, tanto quanto possível, do grau de contaminação, por contacto com o ar (88).

A composição química de algumas superfícies desempenha um papel crucial, ao potenciar a adsorção e retenção de macro-moléculas e a adesão de células, favorecendo a osteocondução e proporcionando, desse modo, uma melhor resposta biológica (30, 33). São as denominadas superfícies bioactivas.

As modificações ao nível da composição química dos implantes, de modo a torná-las bioactivas e potenciadoras da osteointegração, representam, provavelmente, em termos de investigação, o futuro da implantologia (33, 42).

É assim evidente que a resposta biológica dos tecidos biológicos, à colocação de implantes dentários, e o sucesso da osteointegração, são fenómenos complexos e multifactoriais. Dependem de factores físico-mecânicos, como a geometria e a topografia de superfície do implante e de factores químicos, como a composição química da sua superfície (22, 30), local onde ocorrem as interacções com os tecidos biológicos. Existem diferentes formas de favorecer a osteointegração, por modificação das superfícies, por exemplo aumentando a sua rugosidade, revestindo-a com substâncias bioactivas ou incorporando diferentes iões, como o cálcio, o potássio ou o árgon (30, 36, 99-103).

A topografia e a composição química superficial estão fortemente interligadas. Alterações introduzidas na primeira conduzem a modificações ao nível da segunda, e vice-versa (33, 41, 77), pelo que, é importante que, quando se analisa e compara a resposta biológica de implantes, com distintas superfícies, as diferenças sejam observadas com base nestes dois parâmetros (77). De outra forma, estaremos a assumir, erradamente, que a composição química superficial é igual e constante, apesar de os implantes poderem ter sido submetidos a tratamento de superfície distinto.

Apesar desta evidência, a generalidade da investigação *in vitro* e *in vivo*, não tem valorizado convenientemente, a composição química superficial dos implantes.

1.3. Tratamentos de superfície

Conforme foi referido, a superfície dos implantes reveste-se de extrema importância, já que, é nesta zona que se estabelecem as ligações entre o material implantado e os sistemas biológicos (88, 89, 104-106). É importante que apresentem características favoráveis, que promovam respostas adequadas, tanto ao nível molecular como celular (84). As interações entre os materiais e as células são condicionadas pela forma como as proteínas aderem e se organizam à superfície do material. A adsorção proteica depende, por sua vez, da forma como, numa primeira fase, água, iões e biomoléculas se ligam a essa mesma superfície. Sendo assim, as interações ocorridas ao nível atómico e molecular condicionam as interações observadas ao nível celular, sendo todas elas influenciadas pela topografia e pela composição química da superfície (34).

Existem vários tipos de superfícies implantares (107) e várias técnicas de as tratar (34). Esses tratamentos visam, em primeira medida, aumentar a área de contacto do material com os sistemas biológicos, criando rugosidades que favoreçam a migração e adesão das células à superfície, favorecendo a osteogénese, aumentando a aposição óssea e melhorando, desta forma, o fenómeno da osteointegração (84).

Essas técnicas podem ser agrupadas, de forma genérica, em dois grandes grupos; técnicas de adição e de subtracção (34, 35). Nas primeiras há a criação de irregularidades por adição de material, formando-se convexidades à superfície. Nas segundas, os defeitos são produzidos por remoção de material, originando-se concavidades nas superfícies (34). As técnicas de subtracção são tecnicamente mais simples de realizar e proporcionam superfícies com rugosidade mais uniforme e homogénea (108).

Os tratamentos podem ser de natureza mecânica, química ou bioquímica (34). Aos primeiros pertencem técnicas como o corte, o polimento com lixas ou o jactamento das superfícies. Nos segundos incluem-se a imersão em soluções ácidas ou básicas, os métodos electro-químicos e a deposição de substâncias, à superfície, formando revestimentos. A hidroxiapatite é o material mais frequentemente utilizado. Finalmente, ao terceiro grupo pertencem os métodos que visam fixar, à superfície, biomoléculas, das quais se destacam os factores de crescimento, proteínas ou sequências específicas de aminoácidos, procurando aumentar a bioactividade das superfícies (33, 34).

Os primeiros implantes, utilizados por Bränemark e colaboradores, eram maquinados, sem qualquer tipo de tratamento, apresentando-se com valores de rugosidade baixos. Actualmente, a sua utilização está praticamente colocada de lado, apresentando a generalidade dos implantes algum tipo de tratamento de superfície que lhes confere valores de rugosidade superiores (70). As técnicas mais utilizadas, pela generalidade dos fabricantes, são o jactamento com diferentes tipos de partículas, de

distintos diâmetros, sendo as mais utilizadas as partículas de óxido de alumínio, de óxido de silício e de óxido de titânio. Este jactamento é, normalmente, seguido de um acondicionamento da superfície com soluções ácidas, das quais se destacam as baseadas em ácido clorídrico, ácido sulfúrico ou ácido fluorídrico (62). A imersão em ácidos pode ser realizada em condições diversas, nomeadamente de temperatura, pressão e duração de tempo, fazendo com que implantes sujeitos a este tipo de procedimentos possam apresentar propriedades e comportamentos biológicos e clínicos distintos.

Num passado, não muito longínquo, foi igualmente utilizado o bombardeamento da superfície com *spray* de plasma de titânio (34, 77, 108). Este tipo de superfície, apesar de parecer ter um comportamento biológico melhor do que outros, pelo menos numa fase inicial (27), acabou por ser abandonado por variadas razões, nomeadamente por apresentar uma rugosidade excessiva, espessura acentuada, menor homogeneidade do revestimento e pela fragilidade da sua fixação o que conferia propriedades mecânicas mais fracas, aos implantes. Por outro lado também parecia estar mais associada a problemas peri-implantares e a reabsorção óssea marginal (41, 58, 109).

Os diferentes tratamentos a que as superfícies podem ser submetidas, modificam a topografia de superfície, nomeadamente a sua microtopografia e concretamente a rugosidade (25), podendo alterar igualmente, a sua composição química (110).

O futuro, nesta área, parece residir na inovadora tecnologia de aplicar dois ou mais tratamentos ao corpo de um mesmo implante. O objectivo é proporcionar diferentes graus de rugosidade, no mesmo implante, procurando desta forma, beneficiar das vantagens que cada um deles oferece em relação à fixação dos tecidos moles, à osteogénese, à estabilidade primária e secundária que se pretendem alcançar e à resistência ao estabelecimento de infecções peri-implantares (62).

1.4. Materiais utilizados no fabrico de implantes dentários

O material utilizado na confecção do núcleo dos implantes é muito importante porque tem de apresentar uma série de propriedades físicas, mecânicas e químicas, favoráveis. Tem de ser biocompatível, garantindo a segurança biológica dos indivíduos, e tem de ser resistente às enormes cargas mastigatórias a que irá ser submetido (17, 76).

Ao longo dos tempos, vários foram os materiais utilizados na confecção de implantes dentários, embora só alguns promovessem uma verdadeira osteointegração.

Até ao século XVIII, os materiais mais utilizados resumiam-se ao marfim, osso, conchas de moluscos, dentes humanos transplantados e o chumbo, que se acreditava ser

biocompatível (1). Mais tarde, e até finais da década de setenta, do século passado, passaram a utilizar-se outros materiais, metais ou ligas metálicas, como as ligas de ouro e irídio, a platina iridiada, o aço inoxidável, o tântalo, as ligas de cromo-cobalto-molibdénio e as de titânio-alumínio-vanádio (Ti_6Al_4V) e o carbono vitrificado (1, 17). Este último foi sendo modificado, dando origem à porcelana madrepórica e à cerâmica aluminosa. As ligas de cromo-cobalto-molibdénio apresentavam boa biocompatibilidade e boa resistência mecânica, mas baixa resistência à corrosão. O aço inoxidável (316L), pela sua fraca biocompatibilidade, tinha indicação clínica muito limitada (111). As ligas de titânio-alumínio-vanádio apresentavam uma excelente resistência à corrosão, sendo ainda hoje, muito utilizadas, principalmente em ortopedia (112).

P-I Brånemark, com os seus estudos, revolucionou a implantologia oral, também ao nível dos materiais utilizados, ao defender o uso do titânio comercialmente puro e das suas ligas, na medicina dentária. Actualmente, pelas suas excelentes propriedades e características, estes materiais dominam o panorama da implantologia oral, sendo poucos os exemplos de implantes dentários confeccionados, para fins comerciais, com recurso a outros materiais (25, 27, 41).

Globalmente, os implantes dentários podem ser divididos em dois grandes grupos: os metálicos e os não metálicos. Os primeiros, os mais utilizados (17), podem ser formados por titânio comercialmente puro ou por ligas de titânio, como as ligas de titânio-alumínio, titânio-zircónia-nióbium ou titânio-alumínio-vanádio. Podem ainda ser formados a partir de outras ligas metálicas como as ligas de cromo-cobalto-molibdénio, de tântalo ou ainda de aço inoxidável (17). Os segundos, não metálicos, podem ser confeccionados a partir de polímeros ou de materiais cerâmicos. As fracas propriedades mecânicas e a fraca resposta biológica induzida pelos polímeros limitou consideravelmente o seu uso em implantologia oral (17, 76). Dentro do grupo dos materiais cerâmicos incluem-se o biovidro, as cerâmicas de cálcio (113, 114), onde se incluem a hidroxiapatite e o fosfato β -tricálcio, as cerâmicas aluminosas (115), a zircónia (116, 117), as cerâmicas derivadas do carbono e ainda, os óxidos cerâmicos, como por exemplo o óxido de alumínio, o óxido de titânio e o óxido de zircónio (17). Os materiais cerâmicos que, pela sua cor, são considerados mais estéticos, apresentam uma muito boa biocompatibilidade. Apresentam ainda, por vezes, a vantagem de serem materiais bioactivos, pelo que proporcionam ligações mais firmes e mais rápidas ao osso (108, 118, 119). Possuem, no entanto, propriedades biomecânicas mais fracas (120). Hoje em dia, a sua utilização está reduzida ao revestimento de implantes metálicos (37, 38, 76). Um dos grandes problemas observados com os revestimentos é a fraca resistência da sua fixação à superfície dos implantes, procurando-se melhores técnicas que garantam a fixação e permanência *in situ* desses revestimentos, não prejudicando a resposta biológica (89).

Titânio e ligas de titânio – O titânio é um metal que existe, em relativa abundância, na natureza, bio-inerte e biocompatível, apresentando uma excelente resistência mecânica à corrosão (26, 75, 120). É o material de eleição, na confecção dos implantes dentários, pelas suas excelentes propriedades físicas, mecânicas, químicas e biológicas (75, 111). As duas formas de titânio mais utilizadas na implantologia são o titânio comercialmente puro, com percentagens de pureza, da ordem dos 99,75%, e as ligas de titânio-alumínio-vanádio (Ti_6Al_4V) (17, 76). As primeiras são muito utilizadas em medicina dentária e as segundas em ortopedia (24). Estas ligas de titânio também apresentam excelente biocompatibilidade, tendo como grande vantagem, em relação ao titânio comercialmente puro, a sua maior resistência mecânica (76). Esta resistência é conferida pelo alumínio que aumenta a sua força, diminuindo a sua densidade e pelo vanádio que, ao estabilizar uma das fases do titânio, lhe confere resistência à corrosão (112).

Uma das vantagens da utilização do titânio e das suas ligas na confecção de implantes dentários, é a sua grande reactividade originada pela elevada energia de superfície (24). Por esta razão, os implantes formados a partir destes materiais, apresentam uma enorme capacidade para oxidarem e formarem, à superfície, uma camada, de óxidos, protectora (21, 25). Esta camada forma-se de maneira espontânea e imediata após contacto do implante com o ar ou com outros fluidos biológicos, à temperatura ambiente (112). Protege o implante sendo responsável pela sua excelente biocompatibilidade e elevada resistência à corrosão (17, 75, 112). Favorece a adsorção de proteínas extra-celulares e, desta forma, a osteogénese (25, 90, 121), uma vez que, em rigor, as interacções ocorrem entre os sistemas biológicos e esta camada superficial de óxidos (75). Contribui assim, para a sua boa capacidade de osteointegração. Apresenta uma espessura de cerca de 2-5 nm e pode ser aumentada por métodos específicos, como por exemplo por passivação (76). Também aumenta, com o tempo, no organismo, após implantação. Tem ainda a vantagem de apresentar uma taxa mínima de dissolução (61, 76). É formada maioritariamente por dióxido de titânio, embora também estejam presentes as formas de óxido e tri-óxido de titânio (75).

Os implantes em titânio comercialmente puro aliam assim, a boa resistência mecânica do seu núcleo metálico, às vantagens bioquímicas da sua superfície que, devido à oxidação que ocorre, é de natureza cerâmica (75).

A baixa reactividade e a correspondente menor capacidade para se oxidarem é um dos motivos pelo qual os metais nobres, tais como o ouro, a platina ou o paládio, deixaram de ser utilizados no fabrico de implantes dentários (75, 76).

O titânio comercialmente puro tem ainda a vantagem de, sendo um metal pouco corrosivo, apresentar uma baixa taxa de dissolução e libertação de iões para os tecidos adjacentes o que, acredita-se, é positivo para a resposta biológica que se pretende (21,

26, 88, 122). A dissolução e a libertação de iões para o meio envolvente, apesar de também ser baixa (112) é mais acentuada nas ligas de titânio (61, 122, 123). No caso do titânio comercialmente puro os iões libertados são apenas iões de titânio, biocompatíveis, enquanto que nas ligas, para além do titânio, também são libertados iões de alumínio e vanádio, elementos considerados menos biocompatíveis (122, 123) e mesmo tóxicos a partir de determinadas quantidades (26, 61, 76). Em parte, esta baixa dissolução do titânio e das suas ligas, também se fica a dever à referida camada de óxidos que se forma à superfície (17, 26, 76, 112). A dissolução dos materiais e a libertação de iões é mais evidente quando na presença de revestimentos de hidroxiapatite (123), provavelmente devido à maior área de contacto com o meio envolvente (17) e à fragilidade da fixação(41).

Materiais cerâmicos - Constituem materiais orgânicos, bio-inertes, biocompatíveis e, em alguns casos, bioactivos. Praticamente não libertam iões para os tecidos adjacentes (76). Contudo, e apesar de poderem ser materiais bioactivos, a sua menor resistência mecânica, comparativamente com a dos implantes metálicos, limita a sua utilização (116, 124).

É com base no conhecimento de que as superfícies bioactivas potenciam a osteointegração, ao promover uma ligação química ao osso (60, 113, 125, 126), que vários procedimentos têm sido testados, no sentido de tornar a superfície dos implantes, metálicos ou não, bioactiva (98, 103, 115, 116, 120, 125). Uma das formas de o conseguir é revestindo-a com materiais cerâmicos. Os mais comuns são os que utilizam as cerâmicas de fosfato de cálcio (20, 76, 126), de entre as quais se destacam a hidroxiapatite (20, 113, 116, 127) e o fosfato β -tricálcico (98, 116). A fluorapatite, uma variante da hidroxiapatite, sendo menos solúvel (128), é mais estável (76), podendo também ser utilizada como material de revestimento (76, 113, 116). Outros revestimentos possíveis são o óxido de alumínio, o óxido de titânio e o óxido de zircónio. As vantagens destes revestimentos são o facto de, além de aumentarem a área de contacto ósseo, apresentarem semelhanças bioquímicas com a fase mineral do osso, os cristais de hidroxiapatite, proporcionando locais para a precipitação dos iões de cálcio e fósforo (94). Facilitam, deste modo, a adsorção de proteínas extra-celulares, potenciando e acelerando a formação de tecido ósseo (20, 28, 120, 129-133), ao mesmo tempo que promovem o estabelecimento de ligações químicas directas, ao osso (99, 113, 127). Desta forma, permitem a obtenção de uma estabilidade inicial, forças de ligação e torques de remoção maiores (108). Biesbrock e Edgerton (37), numa revisão da literatura, referem que implantes revestidos a hidroxiapatite apresentam maiores taxas de sucesso para

comprimentos inferiores ou iguais a 10 mm, quando comparados com implantes maquinados de maior comprimento. Também concluíram que este tipo de implantes pode ter vantagens quando utilizado em osso do tipo IV, de menor densidade, o mesmo sucedendo quando utilizados em zonas enxertadas. Dattilo e colaboradores (134) também observaram vantagens na sua utilização em situações limite, tais como, por exemplo, em reabilitações realizadas sobre enxerto de osso ilíaco, em doentes submetidos a mandibulectomias. Contudo, apresentam como possíveis desvantagens, o facto de possuírem uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de infecções bacterianas, por exposição da superfície ao meio oral, já que se trata de estruturas muito porosas, habitualmente mais rugosas (76). Por outro lado, a fixação destes revestimentos à superfície dos implantes é habitualmente mais fraca, o que pode comprometer a sua integridade, conduzindo à sua dissolução ou degradação, com a consequente libertação de partículas para o meio envolvente (20, 28, 120). Cabrini e colaboradores (123) observaram uma maior libertação de iões de titânio e partículas de hidroxiapatite, em implantes confeccionados com ligas de Ti_6Al_4V e revestidos a hidroxiapatite. Estas limitações têm condicionado, em certa medida, a sua utilização em implantologia oral (37, 38). Trata-se contudo, de um assunto controverso já que, apesar das desvantagens mencionadas, apresentam taxas de sucesso comparáveis às dos implantes maquinados, embora proporcionando uma formação óssea inicial mais rápida e evidente e uma ligação directa ao osso com forças de ligação maiores (20, 31, 62, 97, 120, 133, 135).

Para além dos revestimentos cerâmicos, outros revestimentos, têm sido testados, como por exemplo, a incorporação, através de uma rede de siloxano, de uma camada de peptídeos específicos, o complexo glicina-ácido aspártico-serina-arginina, pois sabe-se que é através dele que se estabelecem as ligações entre o implante e o tecido ósseo (106). Radder e colaboradores (125) testaram outro revestimento, o óxido de polietileno-polibutileno de tereftalato, observando vantagens mecânicas relativamente aos materiais cerâmicos. Também a incorporação de iões à superfície, tais como o ião magnésio (30, 36, 99) ou o ião cálcio (100, 102, 103) favorecem o fenómeno da osteointegração. Apesar de todos estes procedimentos se terem revelado promissores e interessantes, não têm constituído alternativas de relevo, sob o ponto de vista comercial (33).

O revestimento de implantes metálicos com materiais cerâmicos ou com peptídeos específicos visa aliar a resistência mecânica do metal à bioactividade conferida pelos revestimentos. Procura-se, desta forma, que os implantes em titânio se tornem bioactivos (30, 76, 89, 103, 127, 128).

Com base nesta bioactividade, Hench e Wilson (136), identificaram dois tipos de implantes endoósseos: os que não proporcionam ligação química ao osso e os que a

proporcionam. Os implantes de titânio constituem um exemplo do primeiro grupo e os implantes de titânio revestidos com hidroxiapatite um exemplo do segundo (99, 136).

Apesar de o titânio constituir um excelente material, apresenta a sua cor como grande desvantagem, colocando, por vezes, enormes problemas sob o ponto de vista estético. Desta forma, a investigação não pára e, a zircónia, que é um material cerâmico, pela excelente estética que proporciona, tem sido alvo de uma atenção particular, podendo vir a desempenhar um papel importante na implantologia oral, num futuro próximo (41, 43, 76, 117, 124, 137). Não constituindo ainda, um material alternativo ao titânio, existem estudos promissores que sugerem que os resultados clínicos possam vir a ser semelhantes aos obtidos pelos implantes confeccionados em titânio comercialmente puro (138, 139).

2. TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido vivo, altamente mineralizado, classificado como um tecido conjuntivo especializado (140, 141). Constitui o principal componente do esqueleto humano e desempenha um papel estrutural, primordial e essencial, porque confere suporte às partes moles, protecção aos órgãos e estruturas vitais, ao mesmo tempo que possibilita a locomoção (142). A sua estrutura e organização permitem resistir às forças e tensões que lhe são transmitidas através dos músculos esqueléticos. É igualmente importante realçar que no seu interior, se aloja a medula óssea, local onde se produzem as células sanguíneas (141). Também constitui um reservatório de sais minerais tais como o cálcio e o fósforo, desempenhando um papel activo na regulação do equilíbrio orgânico e participando activamente no metabolismo destes iões (140). É mesmo, a principal reserva metabólica de cálcio (143).

O osso é um dos tecidos mais duros e resistentes do corpo humano, sendo formado por células e matriz extra-celular mineralizada. Esta é responsável pela elevada dureza e resistência que os ossos apresentam, ao mesmo tempo que lhes proporciona alguma elasticidade (140).

A fim de cumprirem as suas funções, os ossos, encontram-se num estado dinâmico de crescimento e remodelação ao longo da vida (140, 143).

2.1. Matriz óssea

É uma estrutura complexa e organizada, constituída por uma rede de fibras de colagénio, embebidas em sais minerais (143).

É composta por uma parte orgânica, a matriz proteica, por uma parte inorgânica, a substância mineral, e por células. Estes constituintes encontram-se mergulhados em substância fundamental. Tendo em conta o peso, os ossos são formados por 60 a 70% de matéria inorgânica, cerca de 25 a 30% de matéria orgânica, sendo os restantes 10 a 15%, constituídos por água (140). Em termos de volume ocupado, cerca de 36% do volume total corresponde a matéria inorgânica, 36% a matéria orgânica sendo os restantes 28% correspondentes a água (144).

O componente mineral é formado maioritariamente por iões de cálcio e fósforo, organizados sob a forma de cristais de hidroxiapatite (143). Estes cristais apresentam aspecto semelhante a lâminas com cerca de 50 nm de largura, até 8 nm de espessura e comprimento variável (144). A sua fórmula holográfica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (145). Os iões localizados à superfície são hidratados, formando uma camada de iões e água, denominada capa ou camada de hidratação. Esta camada facilita a troca de iões entre o cristal e o líquido intersticial envolvente (141). Os cristais encontram-se densamente acondicionados, de forma ordenada, distribuindo-se ao longo das fibrilas de colagénio e estando envolvidos por substância fundamental amorfa. É esta associação de cristais e fibras que confere as características de dureza e resistência, típicas deste tecido (141). Para além do cálcio e fósforo estão presentes outros iões, em menores quantidades. São exemplo os iões bicarbonato, potássio, sódio, magnésio e citrato (140).

A matriz proteica é formada por células e por fibras colagénicas, principalmente o colagénio tipo I, e por proteínas não colagénicas. As primeiras encontram-se organizadas em fibras dispostas de múltiplas formas, e embebidas em substância fundamental de suporte, que preenche os espaços existentes entre elas. A organização espacial destas fibras proporciona os locais para a nucleação dos cristais de hidroxiapatite (140). O colagénio tipo I, com percentagens da ordem dos 85 a 95% do total de matéria orgânica que constitui o tecido ósseo (146), representa cerca de 50% de todo o colagénio presente no corpo humano (140). Também se observam pequenas quantidades de colagénio tipo III, particularmente no osso imaturo (144). Os restantes 5 a 15% são formados por proteínas não-colagénicas, sendo a maioria de origem óssea e uma pequena quantidade proveniente do plasma sanguíneo (146). As de origem óssea incluem os proteoglicanos formados pelos glicosaminoglicanos, sulfato de condroitina e sulfato de heparina, e as glicoproteínas, como a osteonectina, a osteopontina (sialoproteína óssea rica em ácido siálico), a sialoproteína óssea II, a osteocalcina (proteína Gla) e a fibronectina. De entre as proteínas de origem exógena destacam-se a albumina, as citocinas (interleucina, factor de necrose tumoral-TNF e os factores estimulantes de colónias-CSF) e os factores de crescimento (factor de crescimento dos fibroblastos-FGF, factor de crescimento derivado das plaquetas-PDGF e factor de crescimento tipo insulina-IGF) que desempenham um papel importante no ciclo vital das células ósseas, ajudando a controlar a activação celular

e a maturação e mineralização da matriz (144, 147). São incorporadas no osso durante a osteogênese. Para além destas, também podem ser encontradas proteínas ósseas morfogénicas, pertencentes à superfamília TGF- β (144).

A substância fundamental forma uma pequena proporção da matriz orgânica extracelular consistindo num gel viscoso, contendo água, que preenche os espaços existentes entre os diferentes componentes da estrutura óssea. É formada maioritariamente por sulfato de condroitina e ácido hialurónico (144). Confere suporte às estruturas orgânicas, inorgânicas e celulares do tecido ósseo, controla a quantidade de água presente nos ossos e, provavelmente, está envolvida na regulação da formação das fibras de colagénio (140, 147).

O tecido ósseo, inicialmente não mineralizado, denomina-se osteóide e possui habitualmente, uma espessura de 5 a 10 μm (144). Com a mineralização ocorre a sua maturação.

2.2. Células

As células, apesar de ocuparem uma percentagem muito pequena do volume ósseo, desempenham um papel central na manutenção da matriz, através da sua função de síntese e reabsorção.

O tecido ósseo é formado por três tipos de células principais: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. São responsáveis pela síntese, manutenção e reabsorção óssea, respectivamente. Pertencem a duas grandes famílias: as de origem mesenquimatosa e as de origem hematopoiética. Ao primeiro grupo pertencem os osteoblastos e os osteócitos, derivando das células ectomesenquimatosas indiferenciadas ou osteoprogenitoras. Ao segundo, pertencem os osteoclastos, derivando de células mononucleadas, do sistema mononuclear fagocitário, precursoras hematopoiéticas (144).

Osteoblastos: São células mononucleadas, especializadas, semelhantes aos fibroblastos. Medem cerca de 25 μm e localizam-se nas zonas onde ocorre formação, remodelação ou reparação óssea. São responsáveis pela síntese das proteínas que compõem a matriz orgânica e pela sua mineralização (143).

Quando na forma activa, apresentam-se como células com aspecto cubóide, polarizadas, com núcleo pálido, proeminente, localizado na extremidade basal, e citoplasma fortemente basófilo devido à presença de abundante retículo endoplasmático rugoso (143). Apresentam complexo de Golgi justanuclear, extenso e desenvolvido,

numerosas mitocôndrias e vesículas de secreção, bem como numerosos contactos intercelulares, do tipo junções comunicantes (*gap junctions*) e junções aderentes (144). O seu citoesqueleto apresenta numerosos microfilamentos e enzimas associadas a sistemas mensageiros intracelulares. Este arranjo complexo proporciona a adesão intercelular e a comunicação entre células, o que auxilia na manutenção da camada de osteoblastos que recobre a superfície do osteóide, garantindo que funcionem de maneira ordenada (144).

Para além da sua acção directa na produção de osso, desempenham um papel regulador importante, na activação das células que o reabsorvem (143, 144, 146).

Osteócitos: São células achatadas e fusiformes que se orientam preferencialmente, com o seu longo eixo perpendicular à superfície do osso (144). São um pouco mais pequenas do que os osteoblastos, medindo cerca de 20 µm. Localizam-se no interior da matriz óssea, em espaços denominados lacunas ou osteoplastos, sendo totalmente envolvidas por matriz extra-celular. Têm origem nos osteoblastos que ficam aprisionados no osso recém-formado (143). As lacunas adjacentes encontram-se interligadas através de uma série de canalículos finos, ocupados por fluido extra-celular e pelos prolongamentos citoplasmáticos dos osteócitos. As células e os seus prolongamentos não ocupam a totalidade da lacuna, sendo o espaço remanescente preenchido pelo fluido extra-celular. Uma vez que não existe difusão de nutrientes, através da matriz calcificada, estes canalículos são responsáveis pela manutenção da vitalidade das células localizadas mais profundamente, proporcionando a troca de metabolitos e a coordenação da sua actividade (140).

Sob o ponto de vista ultra-estrutural, os osteócitos recém aprisionados apresentam um elevado conteúdo de organelos, sendo muito parecidos com os osteoblastos. Com a formação do tecido ósseo, vão ficando cada vez mais afastados da superfície, tornando-se menos activos. Passam a apresentar um núcleo com cromatina condensada, envolvido por uma fina camada de citoplasma, contendo poucos organelos; pouco retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi pequeno (144).

A quantidade de osteócitos, existentes por unidade de volume de osso, varia na razão directa da velocidade de formação deste tecido. Quanto mais rápida a sua formação maior a quantidade de osteoblastos aprisionados, logo maior a quantidade de osteócitos presentes (143).

São responsáveis pela manutenção da integridade da matriz óssea mineralizada, mediando a libertação e deposição de cálcio e contribuindo para a sua homeostasia (143). A sua morte conduz à reabsorção da matriz óssea (141).

Osteoclastos: São células móveis, multinucleadas, contendo numerosas ramificações, sendo responsáveis pela reabsorção e remoção do tecido ósseo (141). Apresentam grande variação quanto ao tamanho, forma e número de núcleos, sendo células gigantes, podendo medir mais de 100 µm de diâmetro e apresentar, em média, 10 a 20 núcleos (144).

Quando activas são altamente polarizadas. O seu citoplasma granuloso, contém múltiplos vacúolos e vesículas contendo enzimas lisossómicas (proteínases de cisteína, colagenases, hidrolases, entre outras), abundantes mitocôndrias e ribossomas livres. Os componentes do retículo endoplasmático rugoso são pouco marcados, sendo o complexo de Golgi nítido. Apresentam receptores de membrana, denominados integrinas, através das quais se fixam às proteínas da matriz óssea (144). Próximo da membrana celular observa-se uma zona que delimita a área de reabsorção, pobre em organelos celulares mas rica em filamentos de actina e microtúbulos. Esta zona é denominada zona clara e constitui a zona através da qual o osteoclasto adere ao osso a reabsorver. Quando em contacto com este, a membrana celular, nessa zona, desenvolve interdigitações citoplasmáticas ou microvilosidades irregulares, com cerca de 50 a 150 µm de comprimento, assumindo o aspecto de múltiplas pregas estriadas denominadas de “bordo rugoso em escova”. Estas microvilosidades aumentam a superfície de contacto com o osso (143) e ajudam a criar um microambiente ácido, isolado, impedindo a difusão das enzimas para os tecidos adjacentes. Da sua acção resultam depressões ou concavidades denominadas lacunas de Howship (146).

Durante a sua actuação, devido à reabsorção óssea, ocorre libertação de cálcio, desempenhando estas células, um papel importante na manutenção da homeostasia deste elemento, a longo prazo (144). Desempenham ainda um papel importante no desenvolvimento e crescimento ósseo, através da libertação de factores de crescimento presentes na matriz extracelular mineralizada.

São recrutados, quando necessário, não existindo um reservatório significativo destas células, em estado inactivo. O seu ciclo de vida útil é de cerca de 10 a 14 dias (144).

Quando o osso se encontra em repouso, não estando em formação nem em reabsorção, a superfície óssea é revestida por uma camada de células achatadas denominadas células de revestimento, que não são mais do que osteoblastos em estado inactivo (143). Apresentam pouca actividade de síntese, possuindo poucos organelos e núcleos mais densos, com cromatina condensada e citoplasma pouco basófilo. Protegem o osso de qualquer actividade de reabsorção por parte dos osteoclastos. Mediante estímulos apropriados podem ser reactivadas para formar osteoblastos (144).

2.3. Estrutura do tecido ósseo

O tecido ósseo maduro encontra-se organizado em camadas ou lamelas, com cerca de 5 µm de espessura cada (144), orientadas de modo a reforçar a sua resistência mecânica às forças que sobre ele incidem. Estas lamelas podem ser de três tipos: circunferenciais, concêntricas ou intersticiais (141).

- as circunferenciais ou primárias são paralelas entre si e circundam completamente as superfícies ósseas, formando duas faixas; uma interna, em torno do canal medular, e outra externa, separando o tecido ósseo dos tecidos adjacentes. Constituem os chamados sistemas circunferenciais interno e externo;

- as concêntricas ou ósteons, como o próprio termo indica, dispõem-se em camadas concêntricas, envolvendo canais vasculares centrais e,

- as intersticiais que resultam do constante processo de remodelação/reparação a que os ossos estão sujeitos, não sendo mais do que porções incompletas das duas anteriores.

O tecido ósseo pode ser classificado quanto à sua morfologia, estrutura macroscópica e microscópica.

2.3.1. Estrutura morfológica

Quanto à sua forma ou morfologia, os ossos classificam-se em ossos longos, curtos, chatos, sesamóides ou irregulares. Os ossos longos são de tipo tubular, sendo o úmero, o fémur e o rádio os exemplos mais paradigmáticos. Os ossos curtos têm uma forma cuboidal e localizam-se no pulso e no tornozelo. Os ossos chatos, tal como o termo indica, são achatados, de baixa altura, pouco espessos e planos. Conferem protecção, sendo exemplos, deste tipo, os ossos do crânio e o esterno. Os ossos sesamóides desenvolvem-se no interior de certos tendões, no local onde estes cruzam as extremidades dos ossos longos, sendo o melhor exemplo, no ser humano, a rótula. Protegem os tendões do esforço e desgaste excessivo. Finalmente, os ossos irregulares são todos os outros que não se enquadram em nenhum destes grupos, apresentando uma forma indefinida (142).

2.3.2. Estrutura macroscópica

O osso classifica-se macroscopicamente, com base na sua densidade e porosidade, em osso compacto ou cortical e osso trabeculado ou esponjoso (147). Estes dois tipos de

osso apresentam funções mecânicas e metabólicas distintas (142, 143). No corpo humano cerca de 85% do osso é do tipo cortical sendo os restantes 15%, do tipo esponjoso (143). Este último possui uma taxa de renovação maior, apresentando essencialmente uma função metabólica. O osso cortical desempenha principalmente, funções mecânicas e protectoras, conferindo a força e a resistência necessárias para suportar o peso do corpo (142).

Osso compacto ou cortical – Osso condensado sendo, grande parte da sua estrutura, fortemente mineralizada (142). Encontra-se organizado em camadas concêntricas, dispostas em torno de um canal central contendo vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. Estes canais neurovasculares, constituem a unidade morfológica fundamental do tecido ósseo e formam colunas ou cilindros que, no caso dos ossos longos, se dispõem paralelamente ao seu longo eixo. São denominados canais de Havers ou Haversianos e, em conjunto com as lamelas concêntricas, formam o sistema Haversiano ou ósteon (140). Cada sistema é formado por 4 a 20 lamelas, sendo este número dependente da capacidade de os nutrientes se difundirem a partir do vaso central, até às células localizadas nas lamelas mais periféricas (144). Comunicam entre si, através de canais intercomunicantes, horizontais, denominados canais de Volkman que perfuram estas colunas ósseas em ângulo recto ou oblíquo e contêm, no seu interior, capilares sanguíneos e linfáticos (140). Através desta rede vascular é garantido o aporte de fluidos orgânicos e nutrientes às partes mais profundas do tecido ósseo.

O interior dos canais de Havers é inicialmente largo sendo as suas paredes recobertas por osteoblastos. Com a deposição sucessiva de tecido ósseo, o seu diâmetro vai diminuindo (140). Esta é a razão pela qual sistemas mais recentes apresentam um canal central mais largo do que os sistemas mais antigos (141).

Osso esponjoso ou trabeculado – É um osso de baixa densidade (147). Constitui a porção interna dos ossos, sendo formado por lamelas apostas umas sobre as outras, formando pontes ósseas finas que delimitam inúmeras cavidades intercomunicantes (142). Essas lamelas dispõem-se de forma irregular, nas diferentes direcções do espaço, suportando, desta forma, melhor as forças que incidem sobre o osso. Denominam-se trabéculas ósseas e têm cerca de 50 μm de espessura (144). Os espaços que compõem este tipo de osso denominam-se espaços medulares e alojam a medula óssea responsável pela nutrição deste tecido. Este tipo de osso não se encontra organizado em sistemas Haversianos.

De acordo com a idade, a medula pode ser activa, hematopoiética, de cor vermelha, ou inactiva, de cor amarela. A primeira contém numerosas células ectomesenquimatosas indiferenciadas e da linhagem sanguínea, apresentando-se preenchida por eritrócitos em maturação, responsáveis pela sua cor vermelha intensa. Aqui se produzem todos os elementos celulares sanguíneos. A segunda é formada maioritariamente por tecido adiposo, responsável pela sua cor amarela, apresentando baixo potencial hematopoiético (141). No recém-nascido todos os ossos se encontram envolvidos na hematopoiese sendo a medula praticamente toda vermelha. Com o envelhecimento, torna-se menos activa e é gradualmente preenchida por adipócitos, estando a medula vermelha confinada apenas a alguns locais (140). Sempre que ocorre um aumento substancial na hematopoiese, a medula amarela pode converter-se novamente em medula activa e recomeçar a produzir células sanguíneas (140).

No entanto, ambos os tipos de osso são formados pelas mesmas células e matriz proteica, sendo a diferença essencialmente estrutural e funcional.

2.3.3. Estrutura microscópica

Sob o ponto de vista microscópico, e em função do seu estado de maturação, o tecido ósseo pode ser classificado em imaturo, primário ou não lamelar e maduro, secundário ou lamelar (140). Ambos são formados pelas mesmas células e constituintes da matriz. As diferenças, entre eles, são essencialmente estruturais e funcionais.

- **Tecido ósseo primário, imaturo ou não lamelar** – encontra-se maioritariamente no feto, nos ossos em desenvolvimento e em crescimento, nos locais de reparação e cicatrização óssea e em algumas situações patológicas, nomeadamente em alguns tumores. É o primeiro osso a formar-se, sendo uma forma imatura e temporária, caracterizando-se por ser um osso pouco mineralizado, apresentando células maiores e mais numerosas (147). As fibras de colagénio são mais irregulares, de diâmetro variável e com uma disposição plexiforme, pouco organizada (140, 141). É precisamente esta disposição irregular que dá origem à designação de osso “em novelo”, como também é conhecido. Constitui cerca de 30% do tecido ósseo. Forma-se rapidamente, a uma velocidade de 30 a 60 mm/dia (143), possuindo uma taxa de renovação elevada (144). Não apresenta arquitectura lamelar nem se organiza em sistemas Haversianos (143). Nos adultos é pouco frequente, estando confinado às suturas dos ossos do crânio, aos alvéolos dentários e a alguns pontos de inserção de tendões (141).

- **Tecido ósseo secundário, maduro ou lamelar** – constitui a maioria do esqueleto, nos adultos (140). É formado por camadas sucessivas, constituídas por fibras de colagénio, altamente organizadas (147). Substitui o tecido ósseo primário durante o processo normal de crescimento e de reparação/regeneração. Divide-se em osso lamelar e osso fibroso ou fascicular. O osso lamelar, predominante, é constituído por lamelas finas sucessivas, com tamanhos compreendidos entre os 4 e 7 μm (141). No interior de cada lamela, as fibras de colagénio maiores, orientam-se de forma altamente organizada, com disposição paralela entre si ou organizando-se em camadas concêntricas em torno dos canais de Havers (141). Observa-se nos ossos longos e na cortical do osso alveolar. É um tipo de osso forte, capaz de resistir a cargas elevadas. Forma-se a um ritmo lento, com velocidades de síntese da ordem dos 0,6 a 1 mm/dia (143, 147). O osso fibroso ou fascicular, não organizado em lamelas, é formado por fibrilas de colagénio espessas, encontrando-se nos locais de inserção dos ligamentos. Proporciona uma união forte entre o tecido ósseo e as fibras ligamentares, com elevada resistência aos esforços (147).

2.4. Periósseo e endoósseo

O tecido ósseo é revestido, externa e internamente, por uma camada fina de tecido conjuntivo fibroso denso, rico em células osteoprogenitoras. A camada externa, em contacto com os tecidos moles, denomina-se periósseo (143). É formada por células osteogénicas responsáveis pela formação e remodelação/reparação do tecido ósseo. A sua forte irrigação garante o fornecimento de nutrientes às camadas mais externas dos ossos. Proporciona igualmente, a interface para a fixação dos tendões, ligamentos e músculos (140). É fortemente irrigado e encontra-se ligado ao osso subjacente através de fibras de colagénio denominadas fibras de Sharpey que podem penetrar a totalidade do osso cortical. É um local onde ocorre intensa actividade metabólica, celular e biomecânica (140).

A camada que recobre a superfície interna dos ossos, incluindo o interior das trabéculas do osso esponjoso, o canal medular, os canais de Havers e os canais de Volkmann, encontra-se em contacto com a medula óssea e denomina-se endoósseo (143). Contribui igualmente, de forma significativa, para o processo regenerativo e remodelativo do osso e para a sua nutrição já que é formado por uma camada única e fina, de osteoblastos e osteoclastos (140).

As principais funções destes dois tecidos são a nutrição e o fornecimento de novos osteoblastos/osteoclastos necessários ao crescimento e remodelação/reparação óssea (141).

2.5. Osteogénese

A maioria dos ossos demora alguns anos a desenvolver-se e a atingir a maturidade. Todos eles derivam do mesênquima (tecido conjuntivo embrionário) formando-se segundo dois processos distintos: ossificação intramembranosa ou ossificação endocondral (142). Independentemente do processo formativo apresentam estrutura microscópica igual (146). O desenvolvimento e o crescimento ósseo são controlados pela hormona do crescimento, pela hormona tiróidea e pelas hormonas sexuais. Após a formação do osso primitivo ou imaturo, este é gradualmente substituído por osso maduro, adulto. Posteriormente, ao longo da vida, a sua remodelação vai ocorrendo a uma velocidade muito menor, respondendo e adaptando-o às forças mecânicas que sobre ele incidem e regulando a homeostasia do cálcio (141).

- **ossificação intramembranosa** (formação óssea membranosa) – Por este processo, os ossos formam-se directamente a partir do mesênquima ou “membrana” conjuntiva primitiva (144, 146), que constitui o modelo dos futuros ossos, diferenciando-se os osteoblastos a partir de células mesenquimatosas indiferenciadas.

Os ossos da calote craniana, maxila e grande parte da mandíbula formam-se desta forma e por isso são denominados ossos membranosos. Este tipo de ossificação também contribui para o crescimento dos ossos curtos e para o aumento da espessura dos ossos longos (141).

- **ossificação endocondral** (formação cartilaginosa) – Neste tipo de ossificação, os ossos formam-se a partir de um modelo cartilaginoso prévio, que precede o aparecimento do tecido ósseo (144, 146). A sua vantagem é o facto de permitir a aplicação de forças ao esqueleto, durante a sua formação. Os modelos cartilaginosos são assim, gradualmente substituídos por osso irregular imaturo (141).

Os ossos longos, as vértebras, os ossos da pélvis e os ossos da base do crânio são formados segundo este modelo e por isso, são denominados ossos cartilaginosos (140).

2.6. Papel metabólico do tecido ósseo

O tecido ósseo contém cerca de 99% do cálcio total do organismo, constituindo o seu principal reservatório e sendo o mais importante regulador da sua homeostasia (141, 147, 148). Constitui a primeira fonte de fornecimento deste ião, sempre que se torna

necessário manter os níveis plasmáticos (calcemia) dentro de valores normais (143). Ao longo da vida, há um intercâmbio constante entre o cálcio do plasma sanguíneo e o dos ossos (141).

Este papel regulador é desempenhado pelos osteócitos sendo a sua actividade controlada directamente pelas concentrações plasmáticas do cálcio e indirectamente, pelas hormonas paratiróidea e calcitonina, segregadas pelas glândulas paratiróide e tiróide, respectivamente, e pela vitamina D (hormona 1,25 dihidroxivitamina D₃ (1,25D)) (148). Para além destes três factores, que são os principais, existem outros que desempenham papéis menores, nomeadamente a insulina, a hormona do crescimento, a hormona tiróidea, os corticosteróides renais, as hormonas sexuais, as citocinas, os factores de crescimento, os eicosanóides e as vitaminas A e C (146, 148).

A acção destes factores e a regulação da calcemia ocorrem principalmente, a três níveis: o intestinal, o ósseo e o renal. Ao nível intestinal por aumento da absorção de cálcio e fosfato; ao nível ósseo por aumento da reabsorção óssea e consequente libertação de cálcio na corrente sanguínea e, finalmente, ao nível renal por aumento da retenção de cálcio (148).

São dois os mecanismos de mobilização do cálcio, a partir dos ossos: um puramente físico, consistindo na transferência de iões, a partir dos cristais de hidroxiapatite para o líquido intersticial e, a partir deste, para a corrente sanguínea e um segundo, mais lento, por acção das hormonas referidas anteriormente (141).

Quando os níveis plasmáticos de Ca²⁺ descem acentuadamente, a paratormona actua directamente sobre o tecido ósseo, estimulando a acção dos osteoclastos e levando a um aumento da reabsorção óssea, com a consequente libertação de fosfato de cálcio para a corrente sanguínea. Em simultâneo, por estimulação dos rins, promove a reabsorção renal do cálcio, acelerando, em simultâneo, a excreção dos iões fosfato pelo que apenas aumenta a calcemia sem o aumento simultâneo da concentração de iões fosfato no sangue. Para além destas acções directas, também tem uma acção indirecta, favorecendo a reabsorção de Ca²⁺, ao nível do intestino delgado, ao estimular a activação da vitamina D, nos rins (141, 148).

A calcitonina, produzida e segregada pelas células parafoliculares da glândula tiróidea reduz a reabsorção da matriz óssea por inibição da acção dos osteoclastos. A sua produção é aumentada quando os níveis plasmáticos de Ca²⁺ sobem. Desempenha um papel menos directo do que a paratormona, tendo um papel de protecção contra a reabsorção excessiva de tecido ósseo, principalmente nas crianças e mulheres grávidas (141, 148).

A vitamina D ou 1,25 diOH, é uma hormona esteróide, que participa no metabolismo do cálcio facilitando a absorção de iões cálcio e fosfato ao nível do intestino delgado. A sua síntese é regulada por um mecanismo complexo sendo necessário, para a sua ocorrência, a captação de radiações ultra-violeta, pela pele. A concentração da forma final 1,25(OH)₂D₃, é regulada pelos rins e depende dos níveis plasmáticos de cálcio e fosfato (148).

O cálcio pode apresentar-se no plasma sob duas formas: uma forma ionizada livre ou ligado a proteínas, como a albumina, ou a aniões como os fosfatos e os carbonatos (148).

Os níveis plasmáticos de cálcio devem ser regulados rigorosamente, uma vez que este ião constitui um elemento crítico no controlo da actividade das células excitáveis, que são excessivamente sensíveis a variações nos seus valores. Se os níveis plasmáticos baixam muito (hipocalcemia) ocorre contracção espontânea dos músculos esqueléticos (tetania). Caso se verifique um aumento considerável podem ocorrer perturbações neurológicas e arritmias cardíacas (148).

Para além desta função, os iões cálcio também participam noutros processos vitais, tais como a coagulação sanguínea, a formação das secreções das glândulas salivares e na regulação do ritmo cardíaco (148).

A fisiologia e a manutenção da integridade óssea são assim processos complexos e controlados por um conjunto de factores, mecânicos e metabólicos. A sua formação é regulada principalmente, pela carga funcional que incide sobre eles, enquanto que a reabsorção óssea é controlada, maioritariamente, pelas hormonas paratiróidea, calcitonina e vitamina D (147).

2.7. Crescimento e remodelação óssea

O osso está permanentemente a ser produzido e reabsorvido, num processo equilibrado que visa a manutenção da forma dos ossos (141). Quando predomina a formação, o osso cresce (144, 146). A formação óssea ocorre apenas durante o crescimento do indivíduo e aquando da cicatrização de uma fractura.

A remodelação óssea consiste numa série de processos que visam a substituição de osso antigo por outro novo, sem modificação da sua forma, bem como, a adaptação do tecido ósseo às forças que sobre ele incidem (141, 143). Não é mais do que uma modificação ou reestruturação interna do osso já existente. Permite igualmente, a substituição de osso imaturo por osso secundário. Trata-se de um fenómeno fisiológico

que ocorre ao longo da vida. O aparecimento e a orientação das trabéculas ósseas estão fortemente relacionados com a intensidade, duração e direcção de incidência das forças que lhe são transmitidas através das inserções musculares. Os esforços e as cargas físicas estimulam a actividade osteoblástica (143).

Este processo de formação/remodelação, a que os ossos estão sujeitos é variável, em termos de duração, nas diferentes espécies animais, sendo de cerca de dezassete semanas no Homem, cerca de doze semanas no cão e de seis semanas no coelho (147). A duração do ciclo de formação/remodelação óssea, também denominado “sigma”, aumenta na proporção directa do tamanho dos animais (147).

2.8. Reparação óssea

Na cicatrização ou reparação óssea estão envolvidos numerosos tipos de células, incluindo os macrófagos, os leucócitos polimorfonucleares e outras células do sistema imunitário. Consiste num processo fisiológico, dinâmico, no qual as células e os seus metabolitos interactivam para reparar o tecido danificado (141).

Sendo um tecido vivo, o osso reage às agressões da mesma forma que outros tecidos orgânicos, desenvolvendo o mesmo tipo de resposta celular e tecidual, isto é, inflamação seguida de cicatrização ou reacção de corpo estranho.

No local da fractura ou trauma cirúrgico ocorre hemorragia e forma-se inicialmente um coágulo ou trombo sanguíneo. Ocorrem mudanças na permeabilidade e no volume dos vasos sanguíneos, com as consequentes modificações no fluxo sanguíneo local. O aumento do aporte sanguíneo à área afectada proporciona o incremento rápido de células sanguíneas, proteínas e factores químicos que medeiam a resposta tecidual inicial. Este coágulo ou trombo bem como os restos celulares e da matriz são fagocitados por macrófagos, sendo substituídos por tecido de granulação, bastante vascularizado, que se vai tornando progressivamente mais fibroso. Células mesenquimatosas diferenciam-se progressivamente em condroblastos que gradualmente, substituem este tecido de granulação, por cartilagem hialina, formando o calo provisório. Este tecido dá origem a um colar em torno das extremidades fracturadas, penetrando no espaço existente entre elas (141). Este calo é posteriormente reforçado por deposição de sais de cálcio no interior da matriz cartilagínea (140, 142). Em simultâneo, o periósseo e endoósseo respondem à fractura com intensa proliferação celular formando um tecido rico em células osteoprogenitoras. Estas células, após activação, começam a depositar uma rede de osso imaturo dentro e ao redor deste calo que se passa a designar por calo ósseo (140). É formado por tecido ósseo imaturo que une provisoriamente as extremidades fracturadas. Sob o efeito de forças controladas que incidem sobre o osso, este calo vai sendo

gradualmente remodelado convertendo-se em osso lamelar maduro, com a completa substituição do calo ósseo por tecido ósseo lamelar. Deste modo, o tecido ósseo tem a capacidade de reparação sem a formação de uma cicatriz (141).

Nas zonas de reparação óssea observam-se, em simultâneo, áreas de cartilagem, áreas de ossificação endocondral e de ossificação intramembranosa (141).

Numa reparação óssea é importante um primeiro período de protecção da zona da fractura, com fixação externa e estabilização, seguido da aplicação de forças controladas. Factores como o tamanho inicial do espaço entre os bordos da ferida, a estabilidade da fixação do osso, bem como a magnitude, a frequência e a duração das forças aplicadas, são determinantes neste processo fisiológico (142, 143)

3. COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DOS IMPLANTES NO TECIDO ÓSSEO

A colocação de um qualquer material no organismo humano pressupõe um conjunto de interações entre os materiais e os sistemas biológicos que culminarão na sua integração ou incorporação, ou na sua rejeição. O resultado final dependerá de numerosos factores, nomeadamente da natureza dos materiais que podem ser classificados, de acordo com a resposta biológica que desencadeiam em: bio-inertes, biotolerados ou bioactivos. Podem também ser descritos como sendo osteogénicos, osteocondutores e/ou osteoindutores (149). Estas propriedades desempenham um papel importante no tipo de comportamento biológico que induzem.

Isto mesmo se aplica aos implantes dentários. Quando um implante confeccionado em titânio comercialmente puro é implantado no osso, mediante uma técnica cirúrgica que se quer o mais atraumática possível, desencadeiam-se uma série de fenómenos que, se pretende, culminem com a incorporação do material no organismo como uma parte integrante do mesmo. Isto porque, o titânio, apesar de ser um material bio-inerte, necessita que se observem determinadas condições locais para que não ocorra a formação de tecido fibroso.

A cirurgia implantar, como qualquer cirurgia, desencadeia uma reacção inicial, de tipo inflamatório, com a chegada ao local de diferentes componentes sanguíneos, entre os quais as células mesenquimatosas indiferenciadas, que, mediante estímulos apropriados, irão diferenciar-se em células da linhagem osteoblástica.

3.1 Materiais bio-inertes, biotolerados e bioactivos

Um material bio-inerte é um material que não desencadeia nenhuma reacção de corpo estranho no organismo onde é implantado (21, 111). São materiais que estabelecem contacto directo com os tecidos envolventes, sem interposição de tecido fibroso. O titânio é um dos melhores exemplos de um material bio-inerte, tal como a zircónia e a alumina (26, 75, 76). Um material bio-tolerado é um material moderadamente aceite pelo organismo. O contacto directo não é total, podendo ocorrer a formação de tecido fibroso entre o material e os tecidos envolventes. O aço inoxidável e as ligas de cromo-cobalto constituem dois exemplos deste tipo de material (111). Os materiais bioactivos são materiais em que não existe apenas um contacto directo, mecânico, com os tecidos envolventes mas também uma ligação química (106, 111). Geralmente estes materiais apresentam, na sua superfície, íons cálcio e fósforo disponíveis para estabelecerem essas ligações. Os fosfatos de cálcio, dos quais a hidroxiapatite constitui o melhor exemplo, e os vidros bioactivos são dois exemplos deste tipo de material (76).

Aliado a este tipo de comportamento que os materiais podem ter relativamente aos tecidos biológicos, também podem apresentar capacidades, mais ou menos, favorecedoras da actividade osteogénica. Um material osteogénico é um material capaz de mobilizar células da linhagem osteoblástica, para um determinado local, e de promover a formação de tecido ósseo (149, 150). Um material osteocondutor é um material que possui a propriedade de conduzir ou guiar a formação de tecido ósseo, à sua superfície, quando implantado neste tipo de tecido, após mobilização de células osteogénicas. Tem a capacidade de orientar o crescimento do tecido ósseo, proporcionando a estrutura ou matriz física para a deposição de novo osso (53, 149, 150). Um material osteoindutor é, por sua vez, um material capaz de promover a formação de tecido ósseo, quando implantado fora deste tecido, por mobilização de células indiferenciadas, pluripotentes, e indução da sua diferenciação em células da linhagem osteoblástica (149, 150). O material considerado ideal será aquele que apresenta, em simultâneo, estas três propriedades: osteoindutor, osteogénico e osteocondutor.

3.2 Osteointegração

Na década de oitenta, do século passado, Brånemark e a sua equipa, introduziram o conceito de osteointegração para descrever o fenómeno observado durante a realização de estudos sobre micro-circulação, em que placas de titânio se fixaram directamente ao osso sem interposição de tecido fibroso. Até esse momento, era normal observar-se a

formação de tecido fibroso, sempre que se inseriam estruturas metálicas no tecido ósseo (21, 61). A osteointegração foi por ele descrita como sendo “uma ligação directa, estrutural e funcional, estabelecida entre o osso vivo, organizado, e a superfície dos implantes, sem interposição de tecido fibroso, sendo essa ligação capaz de suportar cargas funcionais” (21). Esta noção de contacto directo baseava-se em observações com recurso à microscopia óptica (21, 61).

O conceito de osteointegração é um conceito biológico, baseado em critérios histológicos perfeitamente definidos mas impossíveis de aplicar clinicamente (135). Uma vez que a colocação de implantes dentários está associada a naturais expectativas de sucesso, baseadas em critérios clínicos e radiográficos (61, 64, 135, 151), outros autores, nomeadamente Zarb & Albrektsson (69), em 1991, reformularam este conceito, dando-lhe um cariz mais clínico, passando a descrever a osteointegração como um processo em que uma fixação rígida, do tipo anquilose funcional, clinicamente assintomática, de um material aloplástico, era conseguida e mantida no tecido ósseo, enquanto em função. Sendo um conceito histológico, os dados clínicos e radiológicos, necessários para definir um sucesso clínico, não permitem classificar um implante como osteointegrado. (21, 61).

Para que o sucesso clínico seja alcançado é fundamental que se estabeleça, pelo menos parcialmente, uma interface osso-implante forte, capaz de resistir às forças que incidem sobre o implante e capaz de as transmitir ao tecido ósseo envolvente. É quantificada, histologicamente, pela percentagem da superfície do implante que se encontra em contacto directo, efectivo, com o tecido ósseo, sem a interposição de tecido fibroso, e pressupõe que o osso neoformado esteja a distâncias de até 200-400 Å da superfície do implante (61). Segundo Albrektsson e Jacobsson (61), um implante é considerado osteointegrado sempre que se estabelece um contacto ósseo directo superior a 90%. Não está definida a percentagem mínima de contacto que se deve observar para garantir o seu sucesso clínico.

Para que se estabeleça a ligação osso/implante é necessária a obtenção de uma estabilidade inicial, mecânica, alcançada através do contacto e fricção que se observa entre o implante e o leito implantar criado à sua medida. Esta constitui a chamada estabilidade primária. A médio/longo prazo essa estabilidade depende da obtenção de uma ligação biológica com os tecidos envolventes e de uma constante adaptação às cargas que incidem sobre os implantes através de uma permanente remodelação óssea (53). Esta remodelação é complexa e dinâmica e depende da incidência de cargas que vão variando ao longo do tempo, quer em intensidade quer na direcção de incidência (152). Esta estabilidade passa a denominar-se secundária e o seu estabelecimento e manutenção dependem de vários factores sendo fundamentais a qualidade e a quantidade do osso existente no local a implantar, a resposta do tecido ósseo ao trauma

cirúrgico, a biocompatibilidade do material, o desenho e as características da superfície do implante, a técnica cirúrgica, que deve ser o mais atraumática possível, a obtenção de uma estabilidade primária, no momento da colocação do implante, e a ausência de infecção e mobilidade do mesmo durante todo o processo de cicatrização. A longo prazo depende ainda do tipo de reabilitação protética e das cargas que incidem sobre os implantes (21). A osteointegração constitui assim um processo dinâmico, contínuo, complexo e multifactorial (135, 152, 153).

O crescimento ósseo, em torno de um implante, pode ocorrer em dois locais distintos; a partir da superfície do implante, em direcção ao tecido ósseo envolvente e, em sentido inverso, a partir do tecido ósseo em direcção à superfície do implante. O primeiro fenómeno denomina-se osteogénese de contacto e o segundo, osteogénese à distância (53). Para que se verifique o primeiro é imprescindível que ocorra a migração e a colonização da superfície do implante, por células indiferenciadas e da linhagem osteoblástica, num fenómeno denominado osteocondução. O osso neoformado, nesta localização, foi designado por Davies (53) como osso *de novo*. Esta síntese de osso só ocorre em superfícies bioactivas. O segundo ocorre em todos os tipos de implantes (53).

As características da superfície dos implantes, determinarão se ocorre um ou os dois tipos de osteogénese e o conseqüente estabelecimento de uma retenção micro-mecânica simples ou associada a uma retenção química (53).

Apesar de classicamente se considerar imprescindível a ausência de carga na fase de osteogénese (21), esta é possível, mesmo em situações de carga imediata, controlada, desde que os implantes apresentem desenhos e superfícies favoráveis (32, 61, 117, 154, 155).

3.2.1 Interface osso-implante de titânio

A colocação de um implante desencadeia sempre uma cascata de acontecimentos que se iniciam com o preenchimento dos espaços adjacentes ao implante, com um coágulo sanguíneo e a formação de um tecido de granulação. Após alguns dias, este tecido é reabsorvido e substituído por tecido osteóide que, gradualmente, amadurece e se mineraliza (152, 156, 157).

A forma como decorre este processo cicatricial é determinante na evolução do processo de osteointegração e está relacionado com as características do tecido ósseo e do material implantado. As características da superfície do material influenciam a adesão das células, o seu crescimento e a sua expressão genotípica e fenotípica, embora a osteointegração seja alcançada, tanto em superfícies lisas como rugosas, com pequenas

diferenças ao nível histológico, como o comprovam numerosos trabalhos, *in vitro* e *in vivo* (28, 55, 56, 78, 87, 97, 126, 138, 158-160).

Numa primeira fase ocorre uma resposta inflamatória, em tudo semelhante à observada após qualquer trauma infligido ao organismo, com a inevitável necrose tecidual e aumento local, de proteínas como a albumina, fibrinogénio, fibrina, colagénio e imunoglobulinas, essencialmente do tipo IgG, seguido do conseqüente processo cicatricial, com reabsorção do osso necrosado e formação de novo tecido ósseo (161).

O processo de cicatrização abrange três estádios: formação de um coágulo inicial, activação celular e finalmente, a resposta celular, propriamente dita.

Inicialmente observa-se o estabelecimento de um contacto directo entre o sangue e os seus componentes e a superfície dos implantes, formando-se um revestimento biológico, composto por lipídios, açúcares, iões e proteínas específicas, como a fibronectina e a vitronectina (162). A formação desta camada é influenciada pelo tipo de material implantado, pela sua topografia, pela energia e carga de superfície (24). As primeiras células a contactarem com o material são células de tipo inflamatório, sendo provável que modifiquem esta camada de adsorção, através da libertação de citocinas e mediadores inflamatórios (53, 61, 105). Numa segunda fase, por quimiotaxia, são mobilizadas células mesenquimatosas indiferenciadas que aderem à superfície. Unem-se a sequências de aminoácidos contidos nas proteínas da matriz extra-celular, depositadas na superfície dos implantes através de receptores de superfície, específicos, denominados integrinas (105, 160, 163-165). Destas proteínas destacam-se a fibronectina (160, 163) e a vitronectina (164). São estas ligações que desempenham um papel importante na sinalização e na regulação da expressão génica, controlando a actividade celular (79, 105, 163), através de modificações desencadeadas ao nível do citoesqueleto (19, 79, 166). Estas modificações desencadeiam uma cascata sinalizadora, influenciando e regulando várias funções celulares, nomeadamente a capacidade de migração, a proliferação e diferenciação celular, o tempo de vida (163, 167), a síntese proteica e a mineralização (168). A expressão de diferentes sub-unidades de integrinas à superfície dos osteoblastos é influenciada por diversos factores, nomeadamente o tipo de culturas celulares, a topografia de superfície dos implantes e a sua composição química. A influência que as características de superfície exercem na osteointegração pode ser explicada, pelo menos em parte, pela expressão de diferentes sub-unidades de integrinas, à superfície dos osteoblastos (163) e pelas diferenças observadas ao nível da organização do citoesqueleto (19, 79, 166). Posteriormente, as células proliferam e diferenciam-se em osteoblastos secretores, sendo importante a presença de factores de crescimento e citocinas apropriadas (90, 162).

No processo de osteointegração, os primeiros fenómenos ocorrem ao nível atómico e molecular, entre os componentes moleculares do sistema biológico e os átomos da superfície do material passando numa segunda fase, para o nível celular e tecidual. Maioritariamente ocorrem à superfície dos implantes, na interface osso-implante (53, 105, 106, 135, 152, 153, 157, 169), que não é mais do que uma camada amorfa, acelular, rica em proteoglicanos e glicoproteínas, à qual se fixam as células que irão sintetizar a matriz mineralizada (53, 106, 135).

3.2.2 Influência das superfícies na osteointegração

O facto de os fenómenos que constituem a cascata de acontecimentos que culminam com a cicatrização dos tecidos peri-implantares e a osteointegração dos implantes ocorrerem à superfície dos implantes leva a que a generalidade desses fenómenos seja influenciada pelas características da superfície, nomeadamente a sua energia, rugosidade e composição química (18, 22, 27, 53, 78, 90, 129, 135, 166, 170-174).

As células osteoblásticas revelam uma predisposição para superfícies que apresentam alguma rugosidade, contrariamente aos fibroblastos que preferem superfícies mais lisas e às células epiteliais que só se fixam neste tipo de superfícies (87, 175). São sensíveis às características de superfície dos materiais (53, 158, 176, 177), dependendo a sua resposta da macro e microtopografia dos implantes (52, 153, 162, 171, 178-180) que influenciam a sua capacidade de adesão (158, 178, 181), a sua proliferação (178, 181) e a sua expressão genotípica (178, 181) e fenotípica (19, 132, 172). Também a organização do citoesqueleto (19, 79, 166), a orientação espacial que as células adoptam (87, 182) e a síntese (175, 178, 183) e mineralização da matriz óssea (52, 180, 184) são influenciadas por estes factores, nomeadamente a rugosidade.

Em superfícies mais rugosas, os osteoblastos parecem ter maior capacidade de adesão e fixação às superfícies, sendo este processo também mais rápido do que o observado nas superfícies lisas. Proliferam menos mas, em contrapartida, diferenciam-se mais, uma vez que não se conseguem alongar nem esticar tanto como o fazem nas superfícies mais lisas. Promovem maior mineralização da matriz (29, 167, 171, 175, 178, 185, 186).

Nas superfícies mais rugosas observam-se, normalmente, células em menor número, com aspecto cuboidal e morfologia mais diferenciada, desenvolvendo numerosos e longos prolongamentos que originam uma complexidade organizacional

maior. Esta maior complexidade observa-se no estabelecimento de numerosas pontes entre os topos das espiras e entre as várias camadas de células que se formam (170, 175, 187, 188). As células apresentam maior actividade da fosfatase alcalina e produzem mais osteocalcina, o que reflecte um maior grau de diferenciação (90, 171). As características e a actividade que os osteoblastos desenvolvem, neste tipo de superfície, conduzem à aceleração e ao aumento da aposição óssea (41) proporcionando clinicamente, períodos de cicatrização mais curtos, melhores níveis de estabilidade secundária e torques de remoção mais elevados (27, 56, 108, 189). É assim conseguida uma melhor osteointegração com taxas de sucesso clínico mais elevadas do que o observado nas superfícies mais lisas.

Em superfícies mais lisas, os osteoblastos tornam-se mais achatados e mais alongados, com uma aparência de tipo fibroblástico (57), espalhando-se mais (162). Proliferam mais apresentando, no entanto, níveis de diferenciação inferiores, uma actividade específica da fosfatase alcalina mais reduzida, níveis de produção de osteocalcina mais baixos e uma matriz extracelular rica em colagénio mas menos mineralizada (52, 170, 188).

O crescimento dos osteoblastos responde melhor a superfícies com rugosidade (190) criando microambientes favoráveis à formação de osso (175), sendo consensual que superfícies rugosas melhoram a resposta biológica (28, 171) e biomecânica dos implantes (181). Existem numerosos trabalhos, *in vitro* e *in vivo* (55-57, 78, 90, 100, 191), que comprovam a vantagem destas superfícies comparativamente às superfícies maquinadas, menos rugosas. Apesar disso, e desde que as condições sejam favoráveis, todos os implantes, em titânio, independentemente do tipo de superfície, são susceptíveis de alcançar a osteointegração (107).

A influência das superfícies não se verifica apenas sobre as células. Também se faz sentir nas fases iniciais da osteointegração, aumentando a activação plaquetária, a agregação e a retenção de fibrina e outras biomoléculas à superfície (53, 61, 96, 162, 192), bem como na produção de citocinas, do factor de crescimento TGF- β 1, das prostaglandinas E_1 e E_2 e da vitamina $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ (22, 27, 78, 90, 132, 169, 173, 175, 193-196). Davies (53) observou, em estudos *in vitro*, a potenciação destes fenómenos quando em presença de superfícies rugosas, produzidas quer por jactemento quer por ataque ácido.

A topografia de superfície também parece interferir na forma como as células osteoblásticas reagem aos factores locais, endócrinos, reguladores da osteogénese, tais como o factor TGF- β 1, a vitamina $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ e a hormona feminina 17β -estradiol, havendo uma resposta aumentada, quando na presença de superfícies rugosas. Esta influência traduz-se num aumento da produção de tecido ósseo (90, 175, 187, 194, 195).

A incorporação de revestimentos nas superfícies, tornando-as bioativas, como por exemplo a hidroxiapatite, a fluorapatite ou factores de crescimento, também mostrou aumentar a proliferação celular (128) Para além disso também se verificou serem capazes de potenciar outros fenómenos, tais como a adsorção proteica inicial e a expressão de determinados genes osteoblásticos, favorecedores, de forma significativa, da resposta óssea inicial (20, 94, 129).

A interferência das superfícies no fenómeno da osteointegração parece assim ser feita de várias formas, sendo esses efeitos mediados pelas vias da proteína cínase A (165) e da fosfolípase A₂ (188, 196).

Devido à influência que as superfícies exercem nas diferentes etapas que culminarão na osteointegração, todos os procedimentos que, de alguma forma, interfiram com as suas características, podem condicionar ou mesmo comprometer a resposta biológica desencadeada pelos implantes. A limpeza e a esterilização dos implantes, apesar de não modificar a topografia de superfície (90, 186), pode alterar características importantes, como a energia de superfície, o ângulo de contacto e a sua composição química (197, 198). Estas modificações estão relacionadas essencialmente com a incorporação de elementos estranhos, nomeadamente, contaminantes que podem condicionar a resposta biológica por diminuição da adesão celular (197), por alteração na expressão génica e na actividade enzimática (199).

Conforme referido anteriormente, apesar de se saber que a formação e fixação ósseas são melhores para superfícies rugosas não se sabe, quais os valores de rugosidade média considerados ideais, capazes de desencadear as melhores respostas biológicas (58). Há estudos que apontam para valores da ordem dos 1,0 a 1,5 µm como sendo os melhores (55-57, 78).

Também a composição química da superfície dos implantes desempenha um papel importante na resposta osteoblástica, influenciando-a. Cassinelli e colaboradores (198) comprovaram essa influência, sugerindo que a análise da composição química da superfície passasse a fazer parte das análises de comportamento biológico de células, quando em presença de superfícies implantares.

Para além das características das superfícies, também as características do local implantado interferem na osteointegração. Factores locais, como a tensão de oxigénio, a microcirculação e a existência de micromovimentos, também são importantes na diferenciação celular (135, 188). Zonas com baixa tensão em oxigénio, vascularização limitada e sujeitas a micromovimentos, durante o processo de cicatrização, favorecem a condrogénese em detrimento da osteogénese (162, 188)

4. TÉCNICAS UTILIZADAS NA ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DOS IMPLANTES

O facto das interacções com os sistemas biológicos ocorrerem à superfície dos implantes, das respostas biológicas serem melhores para implantes com rugosidade, de existir uma forte relação entre os tratamentos a que são submetidos os implantes e a sua topografia e composição química da superfície e ainda, o facto da caracterização das superfícies, através da sua observação, ser subjectiva e imprecisa, conduziram à necessidade de se desenvolverem ferramentas que permitissem realizar uma análise quantitativa e caracterizar as superfícies, quer sob o ponto de vista físico (54) quer químico (77, 198).

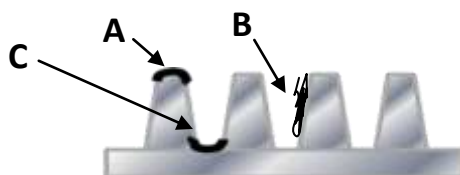


Figura 2.4 – Macroestrutura de um implante em forma de parafuso. A – Topo ou pico da espira; B – Vertente da espira e C – Fundo ou vale da espira.

A macroestrutura dos implantes, em forma de parafuso, é constituída por espiras, cada uma delas formada por topos, vertentes e fundos (figura 2.4). A sua existência comporta dificuldades para a análise da topografia de superfície que passou a poder ser melhor caracterizada, quantitativamente, a partir dos anos noventa, concretamente a partir dos trabalhos de investigação de Wennerberg e colaboradores (200) que desenvolveram, com sucesso, um método óptico, não contactante, de descrição tri-dimensional. Até esse momento, os métodos de caracterização ou eram qualitativos, subjectivos, com recurso à Microscopia Electrónica de Varrimento ou quantitativos recorrendo a profilómetros mecânicos. Neste último caso, as análises eram feitas em superfícies planas ou, quando aplicados em implantes com espiras, apresentavam algumas limitações (54).

Ambas as metodologias, contactante com recurso a um profilómetro mecânico e óptica, não contactante, baseada na Microscopia Confocal de Varrimento Laser, são aceitáveis para a análise da topografia de superfície. É, no entanto, importante ter noção

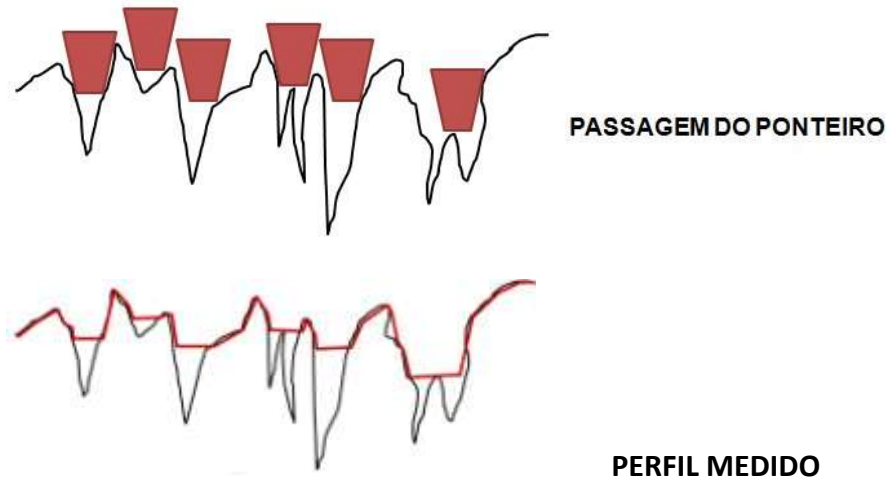


Figura 2.6 – Diagrama representando a influência da ponta do ponteiro na medição do perfil. Dependendo do seu tamanho ocorrerá maior ou menor perda de informação.

A metodologia não contactante utiliza a luz e a forma como é reflectida para registar a posição vertical da fonte, em relação ao plano de focagem. Esta metodologia óptica tem várias vantagens; não contacta os materiais, logo não os danifica, principalmente os mais frágeis, é habitualmente mais rápida e apresenta melhor resolução (54). De entre os métodos não contactantes o que se aplica melhor à implantologia oral é o que recorre à Microscopia Confocal Laser (54), tendo sido desenvolvido um sistema de detecção de foco, específico; o TopScan 3D (Heidelberg Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha) (200).

Tanto a metodologia contactante como a não contactante têm sido aplicadas em diferentes estudos de análise das superfícies (202, 203). Sempre que possível, para realizar medições em implantes, com espiras, os métodos não contactantes devem ser preferidos devido às dificuldades que a geometria da macroestrutura pode colocar à passagem do ponteiro, tornando difícil ou mesmo impossível a obtenção de dados a partir do fundo e das vertentes das espiras. A metodologia com contacto, por sua vez, está mais indicada em superfícies cilíndricas lisas ou em discos (54).

As análises podem ser efectuadas a duas ou três dimensões. No primeiro caso são realizadas ao longo de uma linha e no segundo são feitas numa determinada área pré-

definida (54). Na implantologia oral são preferidas as análises a 3D já que, ao analisarmos uma área e não uma linha, esbatem-se possíveis erros.

Vários são os parâmetros utilizados para caracterizar as superfícies (200, 204, 205), podendo ser agrupados em parâmetros de amplitude ou altura, espaciais e híbridos (54). Os parâmetros de altura dizem respeito à altura das irregularidades, os espaciais à distância horizontal existente entre elas e os híbridos são parâmetros mistos, que acumulam informação fornecida pelos outros dois tipos (54).

O parâmetro mais frequentemente utilizado em implantologia oral, na avaliação da rugosidade de superfície, é o R_a (ou S_a para análises 3D) já que se trata de um parâmetro estável e pouco sensível a topos e fundos ocasionais. É também denominado de *rugosidade média*. Corresponde à média aritmética dos valores absolutos de afastamento dos pontos do perfil em relação à linha média, considerando a superfície analisada (54). Fornece uma boa descrição geral da rugosidade e, particularmente, das variações de altura presentes nas superfícies. Contudo, uma superfície não fica bem caracterizada só com a determinação deste parâmetro já que, por exemplo, duas superfícies podem ter um mesmo R_a , mas um padrão de irregularidades totalmente distinto (54), conforme é possível observar na figura 2.7.

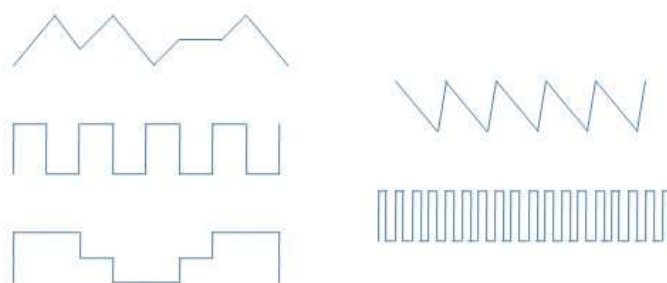


Figura 2.7 – Cinco perfis diferentes com o mesmo desvio médio de alturas (R_a).

Para além do R_a existem muitos outros parâmetros utilizados para caracterizar a rugosidade, sendo, os mais utilizados, em implantologia, o $R_{máx}$, o R_z , o R_{sm} , o R_{sk} e o R_{ku} . O $R_{máx}$, também denominado *rugosidade máxima ou total*, representa a distância vertical entre o topo mais alto e o fundo mais profundo existentes na superfície analisada. O R_z

representa a média aritmética das 5 maiores distâncias verticais, topo-fundo, observadas na superfície analisada. O R_{sm} dá-nos indicação acerca da distância média observada entre irregularidades, no plano horizontal, considerando a superfície analisada. O R_{sk} , denominado *skewness*, dá-nos uma indicação acerca da simetria do perfil analisado, em relação à linha média. Perfis simétricos têm um valor nulo. Perfis onde predominam os topos têm um valor positivo e perfis onde predominam os fundos têm um valor negativo. O R_{ku} , denominado *kurtosis*, dá-nos indicação acerca da existência ou não de irregularidades extremas, topos ou fundos, relativamente à média do perfil em análise. Um perfil pouco irregular, com poucos topos e fundos extremos, tem um valor inferior a três. Pelo contrário, perfis com muitos topos elevados e muitos fundos profundos, extremos, têm um valor superior a três (204, 206).

Quanto mais parâmetros forem utilizados melhor serão caracterizadas as superfícies. Na análise da topografia de superfície de implantes dentários, para além do R_a , devem ser utilizados outros parâmetros, de preferência representativos dos três grupos (54).

Os registos obtidos a partir da análise de uma amostra, quer sejam obtidos por métodos ópticos quer sejam por métodos mecânicos, conduzem a perfis cuja informação terá de ser filtrada para separar os três componentes que constituem a topografia de superfície de qualquer estrutura: a forma, a ondulação e a rugosidade (figura 2.8) (207, 208).

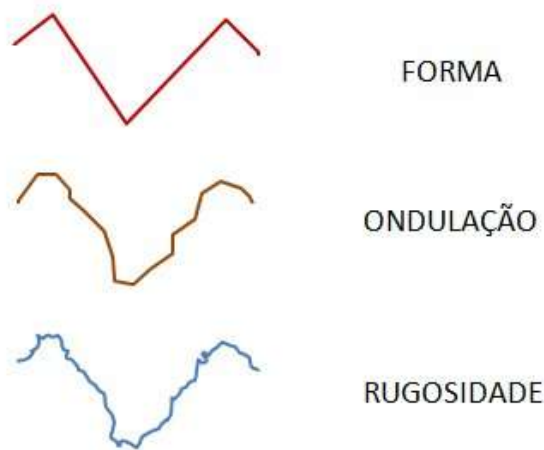


Figura 2.8 – Perfil de um implante dentário mostrando o que é a forma, a ondulação e a rugosidade.

A forma situa-se na escala dos milímetros, a ondulação na escala das centenas de micrómetro e a rugosidade na escala de alguns micrómetros (54). Actualmente já se fala, inclusivamente, na escala nanométrica (33, 41, 59) embora ainda não seja evidente a sua importância (33, 41, 60). É por este motivo, e pelo facto de, actualmente, se considerar que os implantes dentários são melhor analisados à escala micrométrica (60) que, nos diferentes estudos, a rugosidade deve ser separada da ondulação (54). Para facilitar a compreensão, poderemos comparar o que se passa com os implantes, a uma estrada de montanha. O perfil da montanha, formado pelas subidas e descidas que a estrada tem, constitui a forma. Para além desse declive, a estrada apresenta lombas que correspondem à ondulação e, finalmente, o próprio asfalto apresenta irregularidades que constituiriam a rugosidade.

Para analisarmos a rugosidade é necessário que os erros associados à forma e à ondulação sejam eliminados. Em rigor, a rugosidade é o que sobra quando estas duas variáveis são removidas. Não existe consenso a propósito de onde termina a rugosidade e começa a ondulação. O que pode ser entendido como rugosidade para um grande implante, pode ser entendido como ondulação para um implante pequeno (54, 208). Para separar os três componentes recorre-se a filtros Gaussianos, sendo o ponto onde a rugosidade se torna ondulação, denominado *cut-off* (208). A sua selecção é arbitrária, embora, por norma, se considere que deva ser duas vezes e meia a distância média entre topos e, pelo menos, um quinto da área medida. A aplicação de diferentes filtros conduz a resultados quantitativos de rugosidade distintos pelo que, os filtros devem ser sempre mencionados nas análises (54). O efeito da aplicação destes filtros é exactamente igual ao obtido pela acção de uma peneira que filtra a terra, impedindo que passem pedras e tudo aquilo que é maior do que a dimensão dos espaços que constituem a malha da rede. Se mudarmos a rede e colocarmos uma com buracos maiores, algumas das pedras que foram retidas pela rede anterior, passarão e juntar-se-ão aquilo que anteriormente era considerado terra. O que se obtém, após filtragem, é assim variável de acordo com o tamanho da rede ou filtro.

Quando o perfil de uma superfície implantar é filtrado obtém-se dois perfis; o da ondulação e o da rugosidade. O parâmetro que determina o que é ondulação e o que é rugosidade constitui o filtro.

Como não existe consenso relativamente a saber onde termina a rugosidade e começa a ondulação é importante a referência ao filtro utilizado uma vez que os resultados são influenciados pela dimensão do filtro utilizado (54).

4.1.1. Linhas orientadoras para a análise das superfícies

De acordo com Wennerberg e colaboradores (54), as análises da topografia de superfície dos implantes dentários, com espiras, deve ser realizada, preferencialmente, e sempre que possível, com recurso à Microscopia Confocal de Varrimento Laser, concretamente utilizando o aparelho TopScan 3D (Heidelberg Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha) (200). Idealmente, devem ser feitos registos ao nível dos topos, das vertentes e dos fundos das espiras, uma vez que os valores habitualmente, não são iguais nessas três localizações. Devem ser realizadas medições em, pelo menos, três topos, três vertentes e três fundos, de um mesmo implante. Para se determinar o valor de rugosidade média de um determinado tipo de implante, é suficiente a realização destas medições em três implantes (54). A ondulação deve ser separada da rugosidade mediante a utilização de filtros Gaussianos apropriados, seleccionados de acordo com o tipo de superfície em análise. Deve ser sempre mencionada a dimensão da área analisada e o filtro utilizado (200). A análise numérica da rugosidade deve ser realizada recorrendo a, pelo menos, um parâmetro de altura, um espacial e um híbrido, sendo que, o R_a (ou S_a para análises 3D) é o preferido de entre os parâmetros de altura. As análises, sempre que possível, devem ser tri-dimensionais (54).

4.2. Análise química de superfície

A análise da composição química da superfície dos implantes pode ser efectuada de forma quantitativa ou qualitativa, utilizando diferentes metodologias, sendo, as mais utilizadas, a espectrometria de electrões Auger (AES), a espectrometria de raios-X por energia dispersante (EDS), a espectrometria de fotões por raios-X (XPS) e a espectrometria secundária de massa iónica (SIMS) (75, 201). Cada um destes métodos apresenta diferentes graus de resolução, tendo as superfícies dos materiais em análise, distintos graus de sensibilidade, a cada um deles.

As técnicas AES e EDS utilizam um feixe primário de electrões para varrer a superfície enquanto que a técnica XPS utiliza um feixe de raios-X monocromático. Os feixes de electrões e o feixe de raios-X interactuam com a superfície, ionizando-a. O rearranjo dos átomos excitados origina energia que é projectada sobre a forma de um feixe de electrões secundários ou fotoelectrões, no caso das técnicas AES e XPS, ou na forma de um feixe de raios-X, no caso da técnica EDS. A energia originada é variável e dependente do átomo inicial que lhe deu origem sendo característica de cada elemento químico. Desta forma, quantificando a energia libertada é possível determinar os elementos químicos presentes nas amostras analisadas. A técnica SIMS recorre ao bombardeamento das superfícies com feixes energéticos de iões primários. Deste

bombardeamento resulta a projecção, a partir da superfície, de iões secundários que, sendo captados, são analisados num espectrómetro de massa. Desta forma são identificados os elementos químicos presentes na amostra (75).

Os electrões secundários produzidos na técnica AES denominam-se electrões de Auger, designação a partir da qual deriva o nome da técnica: espectrometria de electrões Auger (75). Esta técnica é mais complexa do que a técnica XPS sendo os espectros mais difíceis de quantificar. No entanto, é uma das técnicas mais rápidas e sensível (75).

A profundidade da superfície analisada é variável de acordo com a técnica, sendo de alguns nanómetros, até cerca de 4-10 nm (209), para a técnica XPS e de alguns micrómetros para as técnicas EDS e AES. No caso da técnica SIMS, a densidade, alta ou baixa, do feixe de iões utilizados, determina a profundidade a que são realizadas as análises (75).

Estas diferentes técnicas acabam por se complementar devendo os resultados obtidos ser analisados com algum cuidado, quando as superfícies diferem substancialmente entre si, quer em termos de topografia de superfície quer de rugosidade (88).

5. MODELOS EXPERIMENTAIS COM CULTURAS CELULARES

Os estudos relativos a qualquer material novo, aloplástico, seja um implante ou não, visando determinar as suas características físicas, químicas, de biocompatibilidade e a sua segurança biológica, iniciam-se com testes realizados *in vitro* (104, 179, 210). Numa fase seguinte procede-se à experimentação *in vivo* (211). Os primeiros realizam-se utilizando culturas celulares com células semelhantes às dos tecidos onde se vai proceder à colocação do material ou do implante, simulando as condições do ambiente fisiológico, o mais aproximadamente possível (104, 210). Os segundos são realizados, numa primeira fase, recorrendo a modelos animais, em condições de experimentação próximas daquelas que se irão observar aquando da sua utilização final. Só numa segunda fase será realizada a experimentação no ser humano. A experimentação *in vivo* é realizada em condições experimentais muito controladas, obedecendo a legislação apertada (111). Só após a passagem por estas diferentes fases é que, caso sejam todas superadas de forma favorável, pode ser iniciada a sua aplicação clínica, em larga escala.

Para além do aspecto funcional, relacionado com a resistência do implante às cargas, revela-se igualmente importante, na selecção dos materiais a utilizar em implantologia oral, a sua biocompatibilidade e a sua segurança biológica. O conceito de biocompatibilidade dos materiais define-se, hoje em dia, como uma resposta apropriada

do organismo à colocação e integração de um material, de acordo com uma aplicação clínica específica (210). A biocompatibilidade está relacionada com as interações estabelecidas entre o material implantado e os tecidos envolventes. Essas interações têm que ser favoráveis para permitir que o material possa ser indicado para utilização clínica. A segurança biológica analisa, entre outros aspectos, a resistência dos materiais, particularmente no caso dos metais, à corrosão, estudando a libertação de iões para os tecidos adjacentes, que poderia comprometer a resposta biológica (212, 213).

O recurso à investigação *in vitro* e a modelos celulares osteoblásticos revela-se de elevado valor para estes estudos sobre a biocompatibilidade e a segurança biológica, estudando a resposta das células à implantação de materiais, pela sua rapidez, custos relativamente mais baixos e elevada sensibilidade. Por outro lado reduzem a necessidade de se recorrer à experimentação e ao sacrifício animal (210). Tem ainda a vantagem de nos permitir um maior controlo sobre os factores envolvidos (213), evitando o viés de conclusões.

Vários são os tipos de células utilizados em trabalhos de investigação, apresentando diferentes origens e graus de maturação (193), procurando, todas elas, reproduzir, tanto quanto possível, o comportamento das células humanas. Normalmente, as mais utilizadas são (94, 169, 171, 173, 182):

1. células MG63,
2. células FRC,
3. células OCT-1,
4. células MLO-Y4,
5. células de origem humana .

As primeiras são provenientes de osteosarcomas humanos sendo células que apresentam um fenótipo correspondente ao dos osteoblastos relativamente imaturos. As segundas são células fetais provenientes da calvária de rato, multipotentes, indiferenciadas. As terceiras também são provenientes da calvária de ratos adultos, mas mais diferenciadas, correspondendo a osteoblastos secretores. As quartas são osteócitos, sendo células já perfeitamente diferenciadas (193). Finalmente, as últimas, são células indiferenciadas ou osteoblastos com origem na medula óssea humana. Apesar de poderem ser utilizadas várias linhagens celulares, existindo numerosos trabalhos realizados com cada uma delas (213), há autores que consideram que os modelos experimentais utilizando células indiferenciadas ou ósseas de origem humana são mais

favoráveis, já que recriam condições mais próximas do que é observado na prática clínica (210, 214).

Ao considerar os testes *in vitro*, não podemos deixar de ter presente que existem algumas especificidades e limitações inerentes a este tipo de investigação que devem estar presentes no momento da análise dos resultados, e que podem tornar difícil ou mesmo comprometer a extrapolação dos resultados para a situação *in vivo*:

- **Origem das células** – A possibilidade de se utilizarem diferentes modelos celulares, a maioria deles recorrendo a células não humanas, pode não recriar verdadeiramente, as condições existentes em situação real (66, 210).

- **Grau de maturação das células utilizadas** – Os diferentes modelos utilizam células com variados graus de maturação, desde células indiferenciadas até células adultas, perfeitamente diferenciadas, tais como os osteócitos, apresentando distintas capacidades de síntese. Este facto pode afectar os resultados da experimentação *in vitro* (66, 162, 175, 193, 215, 216). No ser humano, em condições reais, as primeiras interacções com os implantes ocorrem com células mesenquimatosas indiferenciadas, não com células adultas. Boyan e colaboradores (162) observaram diferenças na resposta celular a diferentes graus de rugosidade, influenciada pelo grau de maturação das células utilizadas nos testes. Lohmann e colaboradores (193) verificaram diferenças relativamente ao comportamento de diversas linhas celulares quando na presença de superfícies com diferentes rugosidades. Também Schneider e colaboradores (216) encontraram diferenças nos resultados obtidos para a expressão genica observada entre implantes com diferentes superfícies, quando utilizaram dois tipos distintos de culturas celulares. As diferenças observadas foram atribuídas ao facto de se terem utilizado diferentes culturas celulares.

- **Dificuldade em reproduzir, na totalidade, o ambiente fisiológico dos tecidos** - Isto é particularmente verdadeiro no caso da cavidade oral já que, por um lado, o meio oral tem características próprias, agressivas, de humidade e pH, e, por outro, os implantes dentários são colocados em parte no meio interno e em parte em contacto com esse meio externo, em condições favoráveis à ocorrência de fenómenos corrosivos.

- **Número de células cultivadas** - Nos testes *in vitro* a investigação é realizada com base num só momento de sementeira, o que não reflecte o ambiente fisiológico em que vai havendo um aporte contínuo, ao local, de factores de crescimento, nutrientes e células. Por outro lado, na investigação *in vitro*, as culturas celulares são realizadas com recurso à estimulação celular, visando aumentar o número e a concentração de células disponíveis (169).

- **Dificuldade em trãnsportar os resultados obtidos *in vitro* para o ambiente *in vivo***
– Na investigação *in vitro* não se analisa a resposta dos tecidos aos materiais, tal como acontece na experimentação *in vivo*, mas sim a resposta celular individual. Há mesmo autores que consideram que os resultados obtidos *in vitro* podem não reflectir, de todo, a situação verificada *in vivo* (66, 210).
- **Amostras a testar** - No caso da implantologia oral a forma dos implantes, com espiras, constitui uma desvantagem, sendo prejudicial à adesão celular, razão pela qual estes estudos laboratoriais são, habitualmente, realizados utilizando amostras com a forma de discos.

Devido às limitações inerentes à investigação *in vitro*, os resultados têm de ser analisados de forma cuidadosa (179). Quando a investigação *in vitro* evolui para a realização de testes *in vivo*, os seus resultados devem funcionar como um contributo essencial e legitimador dos resultados obtidos por este último tipo de investigação (210).

Numa segunda fase da investigação, recorre-se a modelos animais antes de se passar aos ensaios clínicos, em seres humanos (211). As descobertas realizadas em modelos animais, também nem sempre se aplicam, directamente ao Homem, devido às diferenças inter-espécie, quer em relação à fisiologia do tecido ósseo, que é diferente nas várias espécies animais, quer quanto aos mecanismos de cicatrização que também são diferentes (135, 211).

No entanto são testes muito importantes que têm sido utilizados há longos anos, na investigação do comportamento biológico induzido por diferentes materiais. A sua aceitação e implementação, em larga escala, numa fase precoce da investigação, está relacionada, entre outras coisas, com a pressão da sociedade moderna e das entidades oficiais no sentido de se reduzirem ao mínimo os ensaios experimentais com recurso a modelos animais.

5.1 Diferenciação osteoblástica

A osteogénese e a conseqüente osteointegração dos implantes dentários pressupõe o recrutamento, a mobilização de células mesenquimatosas indiferenciadas e a sua progressiva diferenciação em osteoblastos. Estas células, sendo pluripotentes, podem-se diferenciar em várias linhas celulares, incluindo a linhagem osteoblástica, mediante estímulos apropriados (217). Este fenómeno é controlado por factores locais e sistémicos (145). Moléculas específicas, sinalizadoras, fixam-se a receptores de superfície, também

específicos, conduzindo a um aumento ou diminuição na expressão de genes designados principais (*master genes*). Estes codificam factores de transcrição que regulam processos chave na diferenciação dos osteoblastos e na expressão dos genes responsáveis pela síntese de proteínas da matriz extracelular óssea (145, 216, 218, 219).

No caso da linhagem osteoblástica, o gene *Cbfa I*, também denominado *Runx-2* (*Runt domain factor-2*) (167, 216, 218-220), e o factor *Osterix (Osx)* (221), são genes reguladores da osteogénese e da diferenciação osteoblástica. O primeiro apresenta várias isoformas (222) e é específico desta linhagem, activando genes que codificam proteínas como a osteocalcina, a sialoproteína óssea, a osteopontina e o colagénio tipo I, e regulando a sua expressão (216, 220). É um gene fundamental na regulação da osteogénese e a sua falta conduz a uma completa ausência de ossificação (223). A expressão destes genes é influenciada pela microtopografia de superfície dos implantes (52, 167, 216, 219, 220). O mecanismo através do qual a topografia de superfície exerce influência sobre a diferenciação osteoblástica e sobre a produção de proteínas ósseas parece ser mediada pelas vias da proteína cínase A e da fosfolípase A₂ (165, 188, 196), sendo as suas acções mediadas pelas integrinas, receptores presentes à superfície das células (194).

A pesquisa e a detecção da expressão de genes osteoblásticos, em fases ainda muito precoces da implantação, parecem ser um forte indicador da formação óssea em fases posteriores (224).

5.2 Marcadores osteoblásticos

Os osteoblastos produzem e segregam uma série de proteínas osteogénicas, nomeadamente o colagénio tipo I e proteínas não colagénicas, tais como, a osteocalcina, a osteonectina, a osteopontina e a sialoproteína óssea. Estas proteínas constituem importantes marcadores ósseos. Estas células também desenvolvem intensa actividade da enzima fosfatase alcalina. O colagénio tipo I e a fosfatase alcalina surgem numa fase inicial da osteogénese (165). A osteopontina, osteocalcina, osteonectina e sialoproteína óssea surgem nas fases mais tardias da diferenciação celular, estando fortemente relacionadas com a produção e mineralização da matriz extra-celular. Estes últimos constituem excelentes marcadores ósseos tardios (217).

As prostaglandinas e o factor *TGF-β1 (Transforming growth factor-β1)* são importantes no fenómeno da osteointegração (90). As primeiras constituem importantes mediadores da diferenciação osteoblástica, intensificando-a enquanto que o segundo, potencia a osteogénese, estimulando a proliferação, diferenciação e a produção de matriz

extra-celular, aumentando a actividade da fosfatase alcalina e diminuindo a actividade osteoclástica (165, 169, 175).

5.2.1 Colagénio tipo I

Constitui a principal proteína estrutural da matriz extra-celular sendo considerado um indicador fiável da síntese da matriz óssea. É um marcador associado às primeiras fases da diferenciação osteoblástica, surgindo na fase inicial do período de proliferação precedendo o aumento da actividade da fosfatase alcalina e a formação da osteocalcina (165). É produzido pelos osteoblastos e por outras células de origem mesenquimatosa, nomeadamente, fibroblastos (188).

5.2.2 Fosfatase alcalina

É uma enzima que constitui um marcador não específico do fenótipo osteoblástico, sendo um indicador fiável da diferenciação osteoblástica, surgindo numa fase inicial da formação óssea, concretamente no período pós proliferação osteoblástica, sendo a sua actividade mais acentuada imediatamente antes de ocorrer a mineralização. Embora o seu papel ainda não seja totalmente conhecido presume-se que esteja associado à preparação da mineralização da matriz extra-celular (90, 171, 188, 225).

5.2.3 Osteopontina

Também denominada sialoproteína óssea 1. É uma glicoproteína, não colagénica, presente na matriz extracelular. Provavelmente desempenha um papel importante na promoção e na regulação da adesão, fixação e proliferação dos osteoclastos à superfície óssea, durante a reabsorção óssea. É produzida por osteoblastos e osteoclastos, desempenhando um papel importante na formação, reabsorção e remodelação óssea (166, 226, 227).

5.2.4 Osteocalcina

Também designada proteína Gla por conter na sua composição, o aminoácido ácido glutâmico γ -carboxílico. É uma proteína não colagénica, cálcio ligante, presente na matriz extra-celular do osso e dentina. É sintetizada apenas por osteoblastos e odontoblastos. Constitui um marcador osteoblástico típico das fases mais avançadas da formação óssea

(90, 188). Desempenha um papel importante na mineralização da matriz e na homeostasia do cálcio (144, 227).

5.2.5 Osteonectina

É uma glicoproteína presente no tecido ósseo que possui a capacidade de se ligar ao cálcio. É produzida pelos osteoblastos durante a formação óssea, sendo importante no início da mineralização, ao promover a formação dos cristais de hidroxiapatite. A sua afinidade pelas fibras de colagénio favorece a ligação destas ao componente mineral do tecido ósseo. Regula o diâmetro das fibrilas de colagénio estando implicada na transformação do tecido osteóide em osso maduro mineralizado (144, 227).

5.2.6 Osteoprotegerina

É uma citocina que controla a reabsorção óssea, inibindo a formação de osteoclastos. Como o próprio nome indica, protege o osso da reabsorção. Constitui um marcador importante no controlo local da reabsorção óssea (90). Existe à superfície dos osteoblastos e, localmente, como factor parácrino solúvel. Liga-se a receptores específicos que estão presentes na superfície dos osteoclastos regulando a sua actividade, nomeadamente, inibindo a sua activação e diferenciação (90, 175).

5.2.7 Proteína morfogénica óssea 2 (BMP-2)

Também denominada proteína morfogénica óssea. É uma glicoproteína, pertencente à família dos factores de crescimento β . Desempenha um papel importante na formação do osso e da cartilagem, ao induzir a diferenciação celular, nomeadamente a osteoblástica (149).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. IMPLANTES UTILIZADOS

Neste trabalho de investigação foi utilizada uma amostra de 348 implantes, confeccionados em titânio comercialmente puro, de graus III ou IV, apresentando desenho cónico ou cilíndrico, tipo parafuso, com espiras e estrutura compacta. As dimensões dos implantes utilizados variaram entre os 8 e 15 mm de comprimento e entre os 3,0 e 5,0 mm de diâmetro (figura 3.1).



Figura 3.1 – Um exemplar pertencente a cada um dos seis grupos de implantes.

Os implantes foram adquiridos a duas marcas comerciais, sendo representativos dos mercados italiano e espanhol, encontrando-se presentemente em utilização clínica, com comprovado sucesso clínico.

Todas as amostras apresentavam-se dentro do prazo de validade de utilização, devidamente acondicionadas e esterilizadas, na sua embalagem de origem. Estas foram abertas apenas no momento da sua manipulação.

Os implantes foram divididos em seis grupos, de acordo com a sua macroestrutura (número e distância entre espiras) e microtopografia (tipo de tratamento de superfície).

GRUPO 1 – Cinquenta e oito implantes maquinados, em titânio comercialmente puro, grau IV, com 3,0 mm de diâmetro e 15,0 mm de comprimento. Apresentavam uma distância entre espiras de 566 μm e uma distância topo-fundo de 354 μm (figura 3.2).

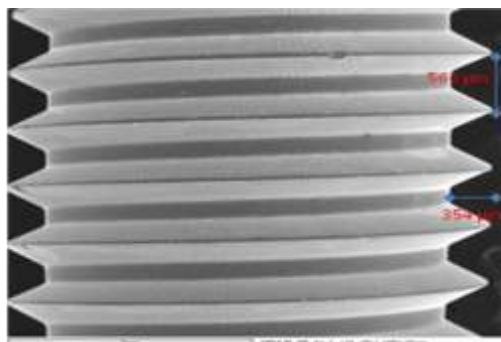


Figura 3.2 - Implante do grupo 1. Maquinado I.

GRUPO 2 – Cinquenta e oito implantes maquinados, em titânio comercialmente puro, grau IV, com 3,0 mm de diâmetro e 15,0 mm de comprimento. A distância entre espiras era de 1200 μm e a distância topo-fundo de 322 μm (figura 3.3).

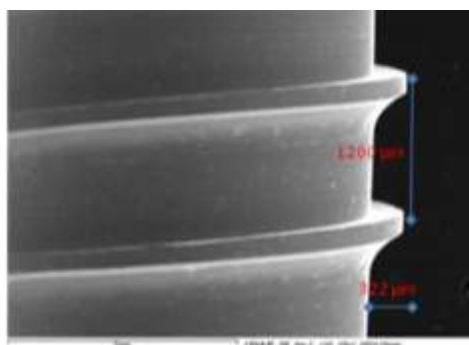


Figura 3.3 - Implante do grupo 2. Maquinado II.

GRUPO 3 – Cinquenta e oito implantes, em titânio comercialmente puro, grau IV, com superfície duplamente tratada, por jactamento e ataque com ácido. As indicações referentes ao tipo de partículas e ao ácido utilizado não foram fornecidas pelo fabricante. Mediam 5,0 mm de diâmetro e 11,5 mm de comprimento. A distância entre espiras era de 557 μm e a distância topo-fundo de 346 μm (figura 3.4).

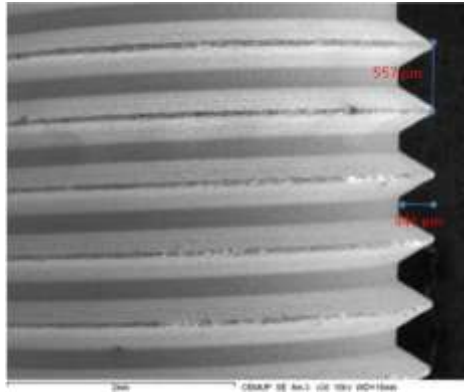


Figura 3.4 - Implante do grupo 3. Jacteamento e ataque ácido I.

GRUPO 4 – Cinquenta e oito implantes, em titânio comercialmente puro, grau III. De acordo com o fabricante, a superfície foi duplamente tratada através da aplicação de um jacto de partículas de óxido de alumínio, seguido de um ataque químico, com ácido clorídrico, fluorídrico e sulfúrico. Apresentavam um diâmetro de 3,0 mm e um comprimento de 8,0 mm. A distância entre espiras era de 940 µm e a distância topo-fundo de 274 µm (figura 3.5).

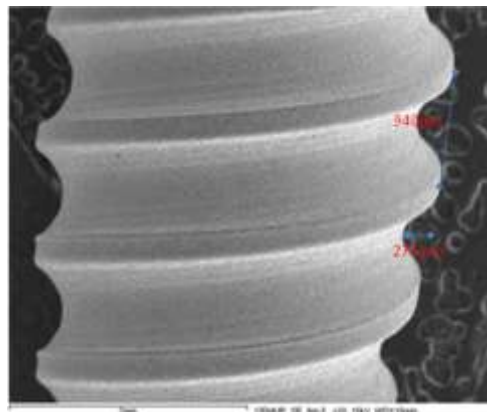


Figura 3.5 - Implante do grupo 4. Jacteamento e ataque ácido II.

GRUPO 5 – Cinquenta e oito implantes, em titânio comercialmente puro, grau IV. De acordo com o fabricante, trata-se de uma evolução dos implantes incluídos no grupo 4. As diferenças entre eles estavam relacionadas com o grau de titânio com que são confeccionados e quanto ao protocolo de tratamento preconizado que utilizou as mesmas substâncias mas em condições de duração de tempo, temperatura, pressão e concentração dos ácidos, diferente. Essas condições não foram reveladas pelo fabricante.

Apresentavam um diâmetro de 3,0 mm e um comprimento de 13,0 mm. A distância entre espiras era de 953 μm e a distância topo-fundo de 314 μm (figura 3.6).

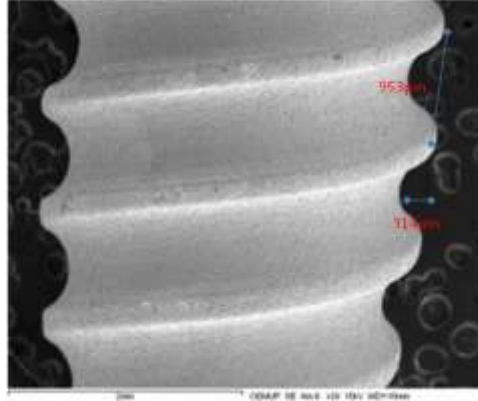


Figura 3.6 - Implante do grupo 5. Jactamento e ataque ácido III.

GRUPO 6 – Cinquenta e oito implantes, em titânio comercialmente puro, grau IV, com superfície tratada por método de adição, mediante aplicação de um *spray* de plasma de titânio (TPS), apresentando 4,2 mm de diâmetro e 14,0 mm de comprimento. A distância entre espiras era de 1190 μm e a distância topo-fundo de 294 μm (figura 3.7).

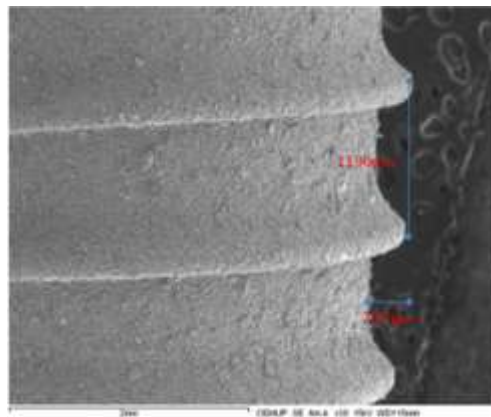


Figura 3.7 - Implante do grupo 6. *Spray* de plasma de titânio (TPS).

De acordo com o tipo de tratamento de superfície, os implantes foram divididos em três classes. A classe 1 formada pelos implantes dos grupos 1 e 2, maquinados, diferindo entre si na sua macrotopografia, concretamente, no número, na disposição e no

afastamento das espiras. A classe 2 formada pelos implantes dos grupos 3, 4 e 5, submetidos a duplo tratamento, por método de jactação, consistindo primeiramente no jactamento da superfície, com diferentes partículas, seguido de um ataque ácido. A diferença entre estes três grupos residia no tipo de partículas e no tipo de ácido utilizado, bem como nas condições de temperatura, pressão e duração de tempo a que foram submetidos os implantes, não tendo essas condições sido reveladas pelos fabricantes. Na classe 3 foram incluídos os implantes do grupo 6, com superfície tratada por um método de adição, concretamente por aplicação de *spray* de plasma de titânio (figura 3.8).



Figura 3.8 - Classe 1 - grupos 1 e 2, maquinados. Classe 2 - grupos 3, 4 e 5, tratados por jactamento e ataque ácido. Classe 3 - grupo 6, com revestimento obtido por *spray* de plasma de titânio (TPS).

No caso dos implantes submetidos a mais do que um tipo de tratamento de superfície tem maior influência o último tipo de tratamento utilizado.

Os pormenores relativos aos protocolos seguidos para as técnicas de TPS, jactamento e ataque ácido não foram revelados nem foram encontrados detalhes na literatura nem nas indicações dos fabricantes.

2. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NAS CULTURAS CELULARES

2.1. Corte dos implantes

Da amostra inicial foram retirados, de forma aleatória e estratificada pelos diferentes grupos, quarenta e quatro implantes pertencentes a cada um dos grupos, para a análise do comportamento biológico de culturas celulares.

Estes implantes foram cortados longitudinalmente, no sentido do seu longo eixo, e transversalmente, tendo os cortes sido realizados com recurso a um disco diamantado, montado num micrótomoto para tecidos duros, não descalcificados (Acuttom, Struers, Dinamarca). O processo foi executado a 2500 rotações por minuto, a baixa pressão, sob refrigeração abundante e lubrificação com soro fisiológico (figuras 3.9 e 3.10).



Figura 3.9 – Micrótomoto de tecidos duros.



Figura 3.10 – Corte dos implantes.

Com vista a conseguir-se a sua fixação, durante o corte, os implantes foram semi-incluídos, em resina epofix, tendo sido utilizado um molde maleável, onde permaneceram por um período de 24 horas, até ocorrer o endurecimento da resina. Com este procedimento, a parte cervical do implante ficou incluída em resina (figuras 3.11 e 3.12).



Figura 3.11 – Imersão da porção cervical dos implantes em resina epofix.



Figura 3.12 – Porção cervical de um implante imersa em resina epofix.

Utilizando esta metodologia foi possível obter amostras, a partir dos implantes, com uma parte plana, susceptível de proporcionar estabilidade quando colocados nos poços de cultura (figuras 3.13 e 3.14).



Figura 3.13 – Implantes cortados.

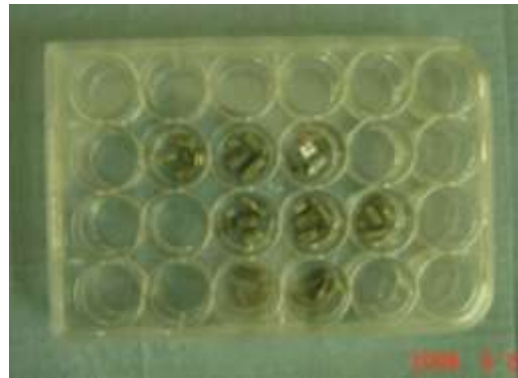


Figura 3.14 – Implantes colocados nos poços das placas de cultura.

Foram cortados apenas os implantes que foram utilizados nas experiências a realizar com culturas celulares.

2.2. Lavagem e esterilização das amostras

Uma vez cortados, e antes da realização do trabalho *in vitro*, as amostras foram submetidas a um processo de limpeza metalográfica, em banho ultra-sônico (figura 3.15), com máxima intensidade, de acordo com a seguinte sequência:

- 1- imersão em acetona, pureza analítica, durante 15 minutos;
- 2- imersão em álcool etílico a 70% (álcool etílico diluído em água destilada na proporção de 70%-30%), durante 15 minutos;
- 3- imersão em álcool etílico a 99,8%, durante 15 minutos e finalmente;
- 4- imersão em água destilada, durante 15 minutos.

Este procedimento teve a duração total de 60 minutos, tendo como objectivo a lavagem, limpeza e desengorduramento dos implantes.



Figura 3.15 – Limpeza dos implantes em banho ultra-sónico.

Após este procedimento, procedeu-se à secagem das amostras numa estufa de marca HERAEUS ELECTRONIC (Gaprüfte Sicherheit, Alemanha), tendo sido submetidas a uma temperatura de 37°C, durante 24 horas (figura 3.16).



Figura 3.16 – Estufa HERAEUS ELECTRONIC (Gaprüfte Sicherheit, Alemanha).

Seguidamente, as amostras foram acondicionadas em mangas individuais (figura 3.17) e submetidas a um processo de esterilização, a uma temperatura de 121°C e uma pressão de 124 KPa, durante 45 minutos (figura 3.18), realizado em autoclave, de marca OMRON ESCS.



Figura 3.17 – Amostras colocadas em mangas individuais.



Figura 3.18 – Autoclave OMRON ESCS.

Com estes procedimentos, procurou-se que todas estas amostras se encontrassem limpas de gorduras e de outras impurezas e devidamente esterilizadas.

De modo a garantir que os implantes utilizados na fase de caracterização topográfica e química se encontravam nas mesmas condições que os implantes utilizados na análise do comportamento biológico, todos os implantes utilizados nessa fase da investigação, também foram submetidos a este mesmo protocolo de limpeza e esterilização.

3. CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS IMPLANTES

Para a caracterização, topográfica e química, da superfície dos implantes, foram utilizadas cinco técnicas:

a) Microscopia Electrónica de Varrimento,

- foi realizada no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP) tendo sido utilizado um aparelho de marca JEOL JSM6301F (figura 3.19).



Figura 3.19 – Microscópio Electrónico de Varrimento, JEOL JSM6301F (CEMUP).

b) Microscopia Confocal de Varrimento Laser,

- foi realizada no Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto (IBMC), tendo-se utilizado um Microscópio Confocal de Varrimento Laser, Leica SP2 AOBS SE (Leica Microsystems, Alemanha) (figura 3.20).



Figura 3.20 – Microscópio Confocal de Varrimento Laser, Leica SP2 AOBS SE (Leica Microsystems, Alemanha) (IBMC).

c) Espectroscopia de fotoelectrões por Raios-X (XPS),

- Esta análise, realizada no CEMUP, recorreu a uma unidade ESCALAB 200A da VG Scientific (UK) com programa informático de aquisição e análise de dados PISCES (figuras 3.21 e 3.22).



Figuras 3.21 e 3.22 - Unidade ESCALAB 200A da VG Scientific (UK) com programa informático de aquisição e análise de dados PISCES (CEMUP).

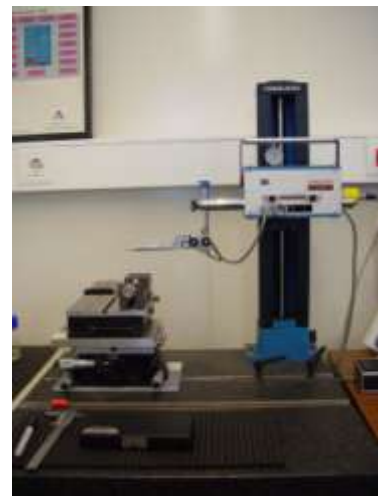
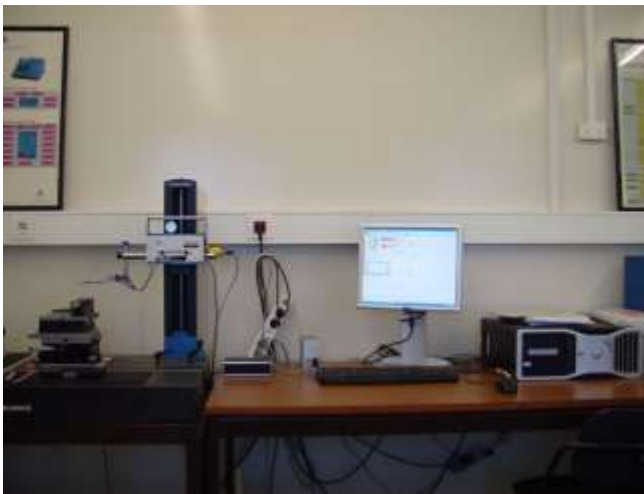
d) Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS),

- foi realizada utilizando um sistema de espectroscopia de raios X Inca Energy 350, de marca Oxford Instruments, associado a um Microscópio Electrónico de

Varrimento JEOL JSM6301F (figura 3.19). Esta análise foi executada igualmente no CEMUP.

e) Profilometria mecânica.

- a realização desta análise recorreu a um aparelho de marca Hommel Werke, Turbo Wave V7.20 (Hommel AG, Hamburgo, Alemanha) (figuras 3.23 e 3.24), tendo sido realizada na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP).



Figuras 3.23 e 3.24 – Perfilómetro mecânico Hommel Werke, Turbo Wave V7.20 (Hommel AG, Hamburgo, Alemanha) (FEUP).

As amostras utilizadas para qualquer uma das cinco técnicas referidas, não necessitaram de qualquer tipo de tratamento prévio, para além do anteriormente referido processo de preparação/esterilização, tendo sido examinada a superfície exposta.

3.1. Macro e microtopografia

3.1.1. Análise qualitativa por Microscopia Electrónica de Varrimento

As características das superfícies, nomeadamente as irregularidades presentes em cada um dos implantes pertencentes aos seis grupos, foram analisadas, de forma

descritiva com recurso a imagens de electrões secundários, obtidas a partir de um Microscópio Electrónico de Varrimento, de marca JEOL JSM6301F, operando a 15 kV.

Para a caracterização da macrotopografia os implantes foram observados sem recurso a técnicas de ampliação e com recurso a imagens obtidas com ampliações de 30x. Para a caracterização da microtopografia foram registadas e observadas imagens com ampliações de 100x, 500x e 2.000x.

Foi utilizado um implante representativo de cada um dos grupos em estudo, escolhido de forma aleatória. Os implantes foram montados em placas de carbono (figura 3.25).



Figura 3.25 – Implantes montados em placa de carbono.

3.1.2. Perfil 3D dos implantes

Adicionalmente foi determinado o perfil tridimensional (3D) da superfície das amostras, com recurso a imagens obtidas através de um profilómetro óptico, não contactante, acoplado a um Microscópio Confocal de Varrimento Laser, de marca Leica SP2 AOBS SE (Leica Microsystems, Alemanha). Este sistema utiliza um ponteiro laser de 1 μm que varre a superfície dos implantes, nas zonas pré-definidas.

Foi utilizado um implante pertencente a cada um dos grupos. A figura 3.26 mostra, esquematicamente, a zona onde foi realizada a recolha das imagens que foram posteriormente, trabalhadas com recurso a um programa informático próprio, da marca

Leica Microsystems Heidelberg GmbH, versão 2.61 Build 1538, LCS Lite (Leica Microsystems, Alemanha).



Figura 3.26 – Zona onde foram efectuados os registos das imagens, em Microscopia Confocal de Varrimento Laser, para determinação do perfil 3D dos implantes.

3.1.3. Rugosidade da superfície

Um dos parâmetros de microtopografia analisado foi a rugosidade das superfícies. Esta foi medida utilizando um perfilómetro mecânico, da marca HommelWerke, T8000 (Hommel AG, Hamburg, D) (figura 3.27). O comprimento da zona medida foi de 1,00 mm, tendo sido utilizado um filtro *cut-off* de 0,08 mm. Foi utilizado um apalpador TK300 com um raio de ponta de 5 μm e um ângulo de 90°. As medições efectuadas foram filtradas usando um filtro M1, de acordo com a norma ISO 11562.



Figura 3.27 – Implante no perfilómetro e posicionamento do apalpador.

As medições foram realizadas em nove implantes de cada grupo, seleccionados de forma aleatória, a partir da amostra inicial. Foram feitas em zonas escolhidas ao acaso,

com base nas especificidades inerentes à metodologia de análise e às características dos implantes, tendo cada zona contribuído com três medições, em posições distintas. Para a análise dos resultados foram consideradas as médias aritméticas das distintas medidas obtidas.

As zonas onde se procedeu às medições estão representadas esquematicamente na figura 3.28 e na tabela 3.1.

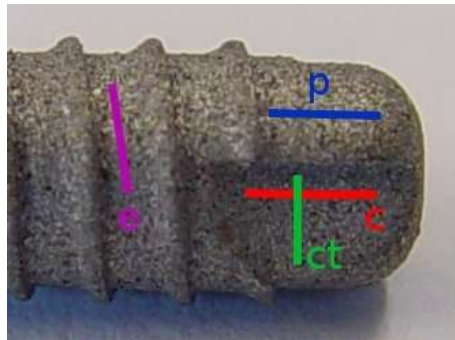


Figura 3.28 – Identificação das zonas consideradas para efeitos de medição da rugosidade de superfície: e – fundo da espira; p – ponta; c – chanfro e ct – chanfro transversal.

		LOCALIZAÇÃO			
		Fundo da espira (e)	Chanfro (c)	Chanfro transversal (ct)	Ponta (p)
GRUPOS	1		X		
	2	X	X	X	X
	3		X	X	
	4	X			
	5	X			
	6	X	X	X	X

Tabela 3.1 – Localização das medições efectuadas com o perfilómetro mecânico, para cada um dos grupos de implantes.

Para a caracterização quantitativa da rugosidade dos implantes foram avaliados vários parâmetros, tendo sido escolhidos os considerados mais importantes: o R_a , o $R_{máx}$, o R_z , o R_{sm} , o R_{ku} e o R_{sk} . Estes parâmetros permitem fazer uma boa caracterização de uma superfície implantar (200). Neste conjunto de parâmetros estão incluídos parâmetros de amplitude; o R_a , o R_z e o $R_{máx}$, parâmetros espaciais; o R_{sm} , e híbridos; o R_{sk} e o R_{ku} (206).

3.1.3.1. Procedimentos analíticos e estatísticos

Com o objectivo de minimizar o erro de viés todos os aparelhos utilizados foram previamente calibrados segundo o método do fabricante. Simultaneamente, e com o objectivo de minimizar o erro de precisão, em todas as medidas foram consideradas as médias aritméticas de três leituras sucessivas. De salientar que, previamente, foi realizada uma análise de concordância das três medidas emparelhadas, resultante de três leituras em cada um dos pontos medidos [Friedman ($p < 0,05$)].

A análise da rugosidade foi realizada numa amostra aleatória de cinquenta e quatro implantes pertencentes aos seis grupos (nove implantes por grupo). O factor de rugosidade R_a , pela sua importância, foi utilizado para averiguar a existência de diferenças capazes de distinguir os seis grupos de implantes analisados. Para os grupos 2 e 6, que permitiram a obtenção de valores de R_a em quatro localizações diferentes, procuramos verificar a existência de diferenças intra-implantes.

Para a análise estatística recorreu-se ao programa informático SPSS (Versão 13.0) (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA).

Pelo facto, de não se verificarem os pressupostos para a utilização de testes paramétricos, utilizaram-se para o efeito os testes: Friedman, Kruskal-Wallis, U-Mann Whitney e Wilcoxon.

3.2. Composição química da superfície

A composição química dos implantes, pertencentes a cada um dos grupos, foi analisada, sob o ponto de vista quantitativo e qualitativo, com recurso às técnicas de XPS e EDS, respectivamente. A técnica XPS, uma das mais importantes utilizada na análise química da superfície dos implantes (77, 88, 92, 228-231), foi realizada utilizando uma unidade ESCALAB 200A da VG Scientific (UK), com programa informático, de aquisição e análise de dados, PISCES. Foi utilizada uma fonte de raios X, acromática, com um ânodo

de Al ($K\alpha$), operando a 15KV e 300W. O espectrómetro foi calibrado com referência à risca Ag $3d_{5/2}$ (368.27 eV) e foi operado em modo CAE com uma energia de passagem de 50 eV. A aquisição do espectro foi efectuada a uma pressão inferior a 10^{-6} Pa e com um ângulo de emergência de 90° , relativamente à superfície. A análise de dados foi realizada utilizando o ajuste de picos com uma forma Gaussiana-Lorentziana e a subtração do fundo tipo Shirley (ou linear, tendo em conta os dados).

Com esta técnica foi analisada a composição química da camada mais externa da superfície das amostras, concretamente a percentagem atómica dos elementos presentes, até uma profundidade de cerca de 5 a 10 nm. A área analisada, em cada implante, foi de aproximadamente 10 mm^2 .

Nesta análise foram considerados os picos correspondentes a C 1s (carbono), F 1s (flúor), Si 2p (silício), P 2p (fósforo), Ca 2p (cálcio), Ti 2p (titânio), O 1s (oxigénio), N 1s (azoto) e Al 2p (alumínio).

Complementarmente foi realizada, por métodos aproximados, a análise química qualitativa da superfície das amostras – envolvendo uma espessura da ordem de $1 \mu\text{m}$ - com recurso a um sistema analítico de espectrometria de raios X por dispersão de energia (EDS), de marca Oxford Instruments, associado a um Microscópio Electrónico de Varrimento JEOL JSM6301F operando a 15 kV.

Ambas as análises foram realizadas na zona das espiras, de três implantes de cada grupo, escolhidos de forma aleatória, num total de dezoito implantes. Foram realizadas três medições por implante, sendo o valor apresentado para cada implante, a média aritmética obtida.

3.2.1. Procedimentos analíticos e estatísticos

Com o objectivo de minimizar o erro de viés todos os aparelhos utilizados foram previamente calibrados segundo o método do fabricante. Simultaneamente, e com o objectivo de minimizar o erro de precisão, em todas as medidas foram consideradas as médias aritméticas de três estimativas sucessivas. De salientar que, previamente, foi realizada uma análise de concordância das três medidas emparelhadas, resultante de três leituras consecutivas [Friedman ($p < 0,05$)].

A análise de dados foi realizada com recurso ao programa informático SPSS (Versão 13.0) (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). Esta incidiu inicialmente, numa amostra aleatória estratificada por seis grupos, conforme descrito no ponto 1 deste capítulo, totalizando dezoito implantes, com o objectivo de determinar as principais estatísticas descritivas

(valores mínimos, valores máximos, média, desvio-padrão e erro padrão da média) da quantidade relativa de diversos elementos químicos, presentes nos implantes seleccionados. Na segunda fase da análise, foram considerados os elementos químicos: C 1s, O 1s, Ti 2p (2 p1 + 2 p3), P 2p e Pb 4f (4f5 + 4f7), com o objectivo de avaliar concentrações preferenciais estatisticamente significativas nas três classes de implantes, definidas conforme descrito no ponto 1 deste capítulo. Para o efeito, e em virtude do tamanho reduzido da amostra utilizaram-se testes de Kruskal-Wallis e U-Mann Whitney.

4. COMPORTAMENTO DE CULTURAS DE CÉLULAS OSTEoblásticas HUMANAS NA SUPERFÍCIE DOS IMPLANTES

4.1. Culturas celulares

As culturas de células osteoblásticas foram estabelecidas a partir de medula óssea humana obtida em procedimentos cirúrgicos ortopédicos programados, em pacientes saudáveis, não causando qualquer dano adicional aos pacientes. Este material biológico que, de outra forma, seria desperdiçado, foi recolhido após consentimento informado dos pacientes e segundo o protocolo em vigor, da Comissão de Ética da instituição hospitalar onde foi efectuada a recolha. Os pacientes tinham idades compreendidas entre os 30 e 45 anos e não apresentavam qualquer patologia nem efectuavam terapêuticas relacionadas com o metabolismo ósseo.

Todos os reagentes e os *primers* utilizados, neste trabalho, foram adquiridos, salvo as excepções mencionadas, à Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, E.U.A.) e as placas de cultura à Corning (Corning, NY, E.U.A.).

A medula óssea foi cultivada em α -Minimal Essential Medium (α -MEM) (GIBCO Invitrogen, Paisley, Escócia, UK) com 10% de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO Invitrogen, Paisley, Escócia, UK) e suplementado com 50 mg/ml de ácido ascórbico, 2,5 μ g/ml de fungizona (GIBCO Invitrogen, Paisley, Escócia, UK), 100 IU/ml de penicilina (GIBCO Invitrogen, Paisley, Escócia, UK) e 10 mg/ml de estreptomina (GIBCO Invitrogen, Paisley, Escócia, UK). A fungizona é um antifúngico e a penicilina-estreptomina são antibióticos. Têm como função prevenir a contaminação das culturas celulares por fungos e bactérias, respectivamente. As culturas foram incubadas à temperatura de 37°C, numa atmosfera húmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂ e o meio foi mudado duas vezes por semana. Estas culturas foram mantidas até próximo da confluência (70 – 80%, cerca de 10 – 15 dias). A subcultura das células foi efectuada após libertação enzimática da camada celular (tratamento com uma solução de 0,04% de tripsina e 0,025% de colagenase) e realização

de nova cultura em condições semelhantes às descritas. A 2ª subcultura foi utilizada nos estudos de biocompatibilidade dos implantes.

As células osteoblásticas (2ª subcultura) foram cultivadas na superfície dos seis tipos de implantes, a uma densidade de 5×10^4 células/cm², considerando a superfície plana do poço de cultura onde os implantes estavam colocados. A cultura efectuou-se em condições semelhantes às descritas mas na presença de 10 nM de dexametasona, um indutor osteoblástico, e 10 mM β -glicerofosfato, uma fonte de iões fosfato necessários para o processo de mineralização da matriz. Estas condições experimentais favorecem o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico de células de medula óssea humana (232).

Os implantes colonizados foram mantidos, em cultura, durante 33 dias e o comportamento celular foi avaliado, ao longo do tempo de cultura, relativamente à adesão celular à superfície dos implantes, à organização do citoesqueleto de F-actina, à morfologia celular, ao padrão de crescimento celular e a alguns marcadores osteoblásticos nomeadamente, no que diz respeito à actividade da fosfatase alcalina, à expressão génica de proteínas da matriz, à capacidade de formação de uma matriz mineralizada e ao consumo de cálcio ionizado a partir do meio de cultura.

A adesão celular à superfície dos implantes foi avaliada às 3 e 24 horas, a organização do citoesqueleto de F-actina aos 7 e 21 dias, o padrão de crescimento celular aos 7, 21 e 28 dias, a actividade da fosfatase alcalina aos 7, 14, 21, 24 e 28 dias, a expressão dos genes correspondente ao colagénio tipo I, à fosfatase alcalina, à osteoprotegerina e à proteína morfogénica óssea 2, aos 21 dias e a análise da mineralização da matriz extracelular ao dia 28. O consumo do cálcio ionizado, presente no meio de cultura, foi analisado aos 3, 7, 10, 14, 16, 21, 24, 28, 30 e 33 dias.

4.2. Caracterização do comportamento celular

Os implantes colonizados com células osteoblásticas foram caracterizados durante o tempo de cultura, avaliando-se o crescimento celular e o comportamento fenotípico, por métodos bioquímicos, RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*), e observação por Microscopia Confocal de Varrimento Laser e Microscopia Electrónica de Varrimento.

4.2.1 Microscopia Confocal de Varrimento Laser

Os implantes colonizados foram lavados com uma solução de fosfato tamponada (PBS - *Phosphate Buffered Saline*), e fixados com 3,7% de formaldeído, isento de metanol.

Posteriormente, as células foram permeabilizadas com uma solução de Triton 0,1% em PBS. Foi adicionada uma solução de albumina (10 mg/ml de BSA) contendo 1 µg/ml de RNase em PBS. Após 1 hora, esta solução foi removida e adicionada uma solução de faloidina (GIBCO Invitrogen, Paisley, Escócia, UK) que actuou durante 20 minutos, à temperatura ambiente, para visualização dos filamentos de F-actina. Seguidamente foi adicionada uma solução de iodeto de propídeo (10 µl stock/10 ml PBS), para coloração do núcleo. Os implantes submetidos a este tratamento foram observados por Microscopia Confocal de Varrimento Laser utilizando um aparelho de marca Leica SP2 AOBS SE (Leica Microsystems, Alemanha).

4.2.2 Microscopia Electrónica de Varrimento

Os implantes colonizados foram lavados com PBS, e fixados com 1,5% glutaraldeído em 0,14 M tampão cacodilato de sódio durante 10 minutos. Posteriormente, foram desidratados utilizando séries crescentes de álcool (70, 80, 90 e 100%), e submetidos a secagem por ponto crítico. Seguidamente, foram revestidos com uma camada fina de ouro e observados num Microscópio Electrónico de Varrimento (Jeol JSM-6301F) e analisadas por espectroscopia de raios X de dispersão de energia (Voyager XRMA System, Noran Instruments).

4.2.3 Actividade da fosfatase alcalina

Os implantes colonizados foram lavados duas vezes com PBS, e a camada celular foi tratada com Triton 1% a 37°C, durante 1 hora, para lisar as células e libertar o conteúdo citoplasmático.

A actividade da fosfatase alcalina foi avaliada na solução de Triton pela hidrólise do p-nitrofenilfosfato em tampão alcalino (30 min, 37°C) e determinação espectrofotométrica do p-nitrofenol formado a 405 nm, num leitor ELISA (Denley Wellscan) e comparada com os valores obtidos para uma série de padrões de p-nitrofenol. Os resultados foram expressos em nanomoles de p-nitrofenol produzido por minuto e por micrograma de proteína (nmol/min.µg proteína).

O conteúdo em proteína total dos materiais colonizados foi avaliado no lisado celular de Triton 1%, pelo método de Lowry (233). Este método baseia-se na reacção do reagente de Folin-Ciocalteu com os aminoácidos aromáticos (tirosina e fenilalanina), após tratamento com uma solução alcalina, originando um produto azul que é medido espectrofotometricamente. A absorvância foi determinada a 750 nm num

espectrofotómetro de fluxo contínuo (JENWAY 6405) e comparada com os valores obtidos para uma série de padrões de albumina sérica bovina preparados em Triton 1%.

4.2.4 Expressão génica de marcadores osteoblásticos

Os implantes colonizados foram lavados com PBS e submetidos a análise da expressão dos genes GADPH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), fosfatase alcalina, BMP-2, colagénio tipo I, RANKL (*Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*) e osteoprotegerina (OPG) por RT-PCR. Procedeu-se à extracção do RNA da camada celular recorrendo ao Mini Kit RNeasy® (QIAGEN, Valência, CA, EUA), de acordo com as instruções do fornecedor. O RNA foi quantificado através da medição da absorvância das amostras, a 260nm. Meio micrograma do RNA celular total, de cada amostra, foi transcripto inversamente e amplificado (25 ciclos) com o Sistema Titan One Tube RT-PCR System (Roche), com uma temperatura de *annealing*, de 55°C. Os *primers* utilizados estão referidos na tabela 3.2. Os produtos RT-PCR (*Reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) foram analisados, num gel de agarose, a 1%.

Gene	5' Primer	3' Primer
GADPH	5'-CAGGACCAGGTTACCAACAAGT-3'	5'-GTGGCAGTGATGGCATGGACTGT-3'
ALP	5'-ACGTGGCTAAGAATGTCATC-3'	5'-CTGGTAGGCGATGTCCTTA-3'
COL 1	5'-TCCGGCTCCTGCTCCTTA-3'	5'-ACCAGCAGGACCAGCATCTC-3'
BMP-2	5'-GCAATGGCCTTATCTGTGAC-3'	5'-GCAATGGCCTTATCTGTGAC-3'
OPG	5'-AAGGAGCTGCAGTACGTCAA-3'	5'-CTGCTCGAAGGTGAGGTTAG-3'
RANKL	5'-GAGCGCAGATGGATCCTAAT-3'	5'-TCCTCTCCAGACCCTAATT-3'

Tabela 3.2 – *Primers* utilizados na análise da expressão génica.

4.2.5 Concentração de cálcio ionizado (Ca_i) no meio de cultura

As culturas de células osteoblásticas efectuadas na superfície dos implantes foram mantidas por 33 dias, como se referiu na secção 4.1, deste capítulo. O meio de cultura foi recolhido ao longo do tempo de incubação (em cada mudança de meio, duas vezes por semana) e analisado para determinação dos níveis de cálcio, utilizando um *kit* de diagnóstico da Sigma (“Sigma Diagnostics Kit, procedure number 587”).

O cálcio ionizado (juntamente com o fósforo ionizado) é consumido na formação de depósitos de fosfato de cálcio durante o processo de mineralização da matriz. Assim, a determinação dos níveis de cálcio ionizado, presentes no meio de cultura, permite ter uma informação quantitativa do processo de mineralização da matriz. Neste trabalho, os níveis de cálcio determinados reflectem o consumo de cálcio que ocorre entre cada mudança do meio de cultura (intervalos de dois a três dias). Os resultados foram expressos em milimoles de cálcio ionizado por litro de meio de cultura (mmol Ca_i/l).

4.2.6 Procedimentos analíticos e estatísticos

Os resultados apresentados relativos ao comportamento de células osteoblásticas cultivadas na superfície dos implantes, são o resultado de experiências realizadas em culturas celulares obtidas a partir de medula óssea de três pacientes.

Em todas as experiências foram utilizados implantes cortados previamente, de acordo com os procedimentos descritos nas secções 2.1 e 2.2, deste capítulo.

Para a observação das culturas celulares, em Microscopia Electrónica de Varrimento, foram utilizados, no total, três implantes de cada grupo. Foram utilizadas duas metades de implante para cada um dos tempos analisados: 3h, 24h e 28 dias. Para a observação em Microscopia Confocal de Varrimento Laser foram utilizados dois implantes de cada grupo, tendo sido utilizada uma metade para cada um dos tempos de cultura analisados: 7, 21 e 28 dias.

Os resultados apresentados relativos à actividade da fosfatase alcalina/proteína total e à análise da expressão génica por RT-PCR são o resultado de três experiências separadas.

A avaliação da actividade da fosfatase alcalina/proteína total utilizou três amostras dos implantes, pertencentes a cada um dos grupos, por tempo de cultura analisado: 7, 14, 21, 25 e 28 dias, perfazendo um número total de oito implantes, por experiência, considerando os cinco tempos analisados. No total, para esta análise, foram assim utilizados vinte e quatro implantes por grupo.

Para a análise da expressão génica, por RT-PCR, foram utilizados cinco implantes (dez metades), aos 21 dias, por experiência, pertencentes a cada um dos seis grupos analisados. Nesta análise foram utilizados, no total, quinze implantes, por grupo.

Foram assim utilizados, na análise do comportamento biológico dos implantes, um total de quarenta e quatro implantes pertencentes a cada um dos grupos analisados.

Verificou-se, através da análise de variância (MANOVA), a não existência de diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$), entre as três experiências realizadas, quer para a fosfatase alcalina/proteína total quer para a análise da expressão génica, por RT-PCR.

Os resultados quantitativos são apresentados como média \pm desvio padrão. A comparação entre os grupos de implantes foi avaliada pelo método estatístico MANOVA, para $p<0,05$.

RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS IMPLANTES

1.1 Macro e microtopografia

1.1.1 Análise qualitativa por Microscopia Electrónica de Varrimento

Um implante pertencente a cada um dos grupos foi observado com diferentes ampliações, variando entre 30x e 2.000x. Com estas ampliações foi possível observar e caracterizar a macrotopografia dos implantes bem como a sua microtopografia.

A avaliação visual directa e a observação a baixas ampliações (30x) permitiu verificar que todos os implantes apresentavam uma forma semelhante, cónica ou cilíndrica, bem definida, contendo espiras, com uma superfície relativamente homogénea. O implante pertencente ao grupo 6 constituiu a única excepção apresentando, mesmo com baixas ampliações, uma superfície heterogénea, contendo numerosas protuberâncias globulares, evidentes. Apesar de não se observar a totalidade do corpo dos implantes, foi possível constatar que apresentavam macroestrutura com algumas diferenças, não só ao nível do número e da morfologia das espiras, mas também ao nível dos seus topos, vertentes e fundos. Para além disso, verificaram-se ainda diferenças na distância entre espiras, na sua profundidade, na inclinação das vertentes e nos ângulos formados entre si.

Os implantes pertencentes aos grupos 1 e 3 apresentavam macroestrutura semelhante diferindo, entre si, na microtopografia, já que os primeiros são maquinados e os segundos foram submetidos a jactamento e ataque ácido. Os implantes dos grupos 4 e 5 apresentavam macroestrutura semelhante, tratamento de superfície semelhante, que consistiu no jactamento e ataque ácido, embora realizado segundo protocolos distintos, com diferenças, entre eles, menos evidentes, pelo menos em termos teóricos, do que as observadas entre os implantes dos grupos 1 e 3. Essas diferenças eram essencialmente relativas à sua microtopografia. Os implantes dos grupos 2 e 6 apresentavam igualmente, macroestrutura semelhante diferindo igualmente, na sua microtopografia. Os primeiros

eram maquinados, apresentando os segundos uma superfície revestida a *spray* de plasma de titânio.

Com maiores ampliações foi possível observar e caracterizar a microtopografia dos implantes e perceber as diferenças existentes entre eles, que se tornaram evidentes, mesmo entre implantes com tratamentos de superfície com a mesma designação.

A figura 4.1 representa a macrotopografia geral correspondente aos seis tipos de implantes analisados. As imagens são de baixa ampliação (30x) e foram obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento, com electrões secundários.

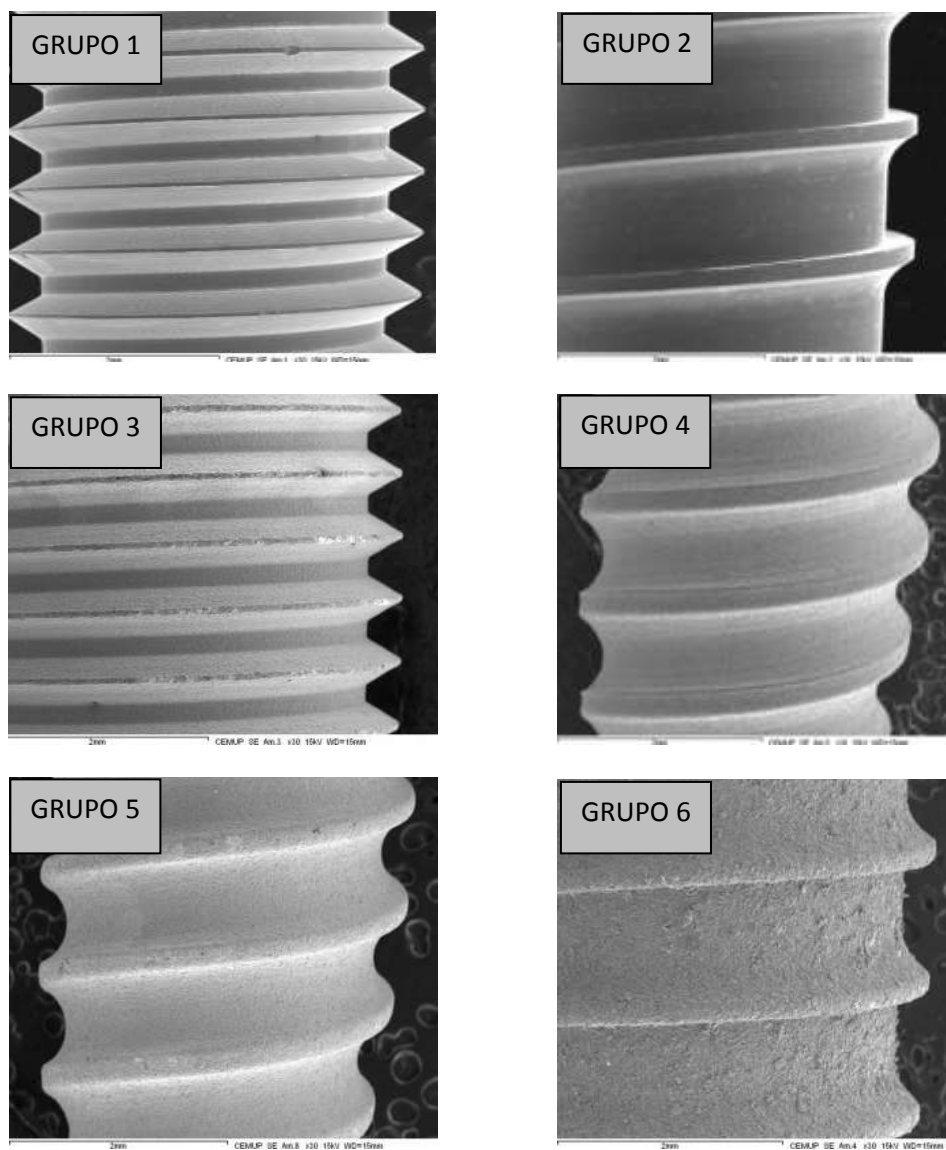


Figura 4.1 – Macrotopografia dos seis grupos de implantes analisados (30x, MEV). As diferenças de tamanho observadas estão relacionadas com o facto de os implantes utilizados apresentarem diâmetro diferente.

Grupo 1 – Implantes formados por 22 espiras, em forma de letra V, com vertentes inclinadas, com topos em forma de fio de faca e fundos em planalto estreito. A distância entre espiras, obtida nas medidas topo-a-topo, foi de 566 μm , que é maior do que a observada ao nível dos fundos. A distância determinada entre o topo-fundo foi de 354 μm .

Grupo 2 – Implantes formados por 7 espiras. Vertentes verticais, num dos lados, dispostas perpendicularmente aos fundos, e em rampa, no lado oposto. Topos arredondados, estreitos, e fundos em planalto largo, com distância entre espiras de 1200 μm igual, ao nível dos topos e dos fundos. Distância topo-fundo de 322 μm .

Grupo 3 – Macroestrutura semelhante à observada para o implante do grupo 1. Implantes formados por 17 espiras. A distância, entre si, ao nível do topo, foi de 557 μm e a distância topo-fundo foi de 346 μm .

Grupo 4 – Implantes formados por 6 espiras afastadas, entre si, 940 μm , semelhante ao nível dos topos e dos fundos. Vertentes com ligeira inclinação, com topos arredondados, em planalto estreito e fundos em planalto largo. A distância topo-fundo foi de 274 μm .

Grupo 5 – Macroestrutura semelhante à do implante 4. Implante formado por 11 espiras contendo vertentes ligeiramente inclinadas. Topos arredondados, em planalto estreito e fundos em planalto largo. A distância entre espiras foi de 953 μm , igual ao nível dos topos e dos fundos e a distância topo-fundo foi de 314 μm .

Grupo 6 – Macroestrutura semelhante à do implante do grupo 2. Implantes formados por 8 espiras. A distância entre elas foi de 1190 μm . As duas vertentes, de cada espira, apresentaram-se diferentes, sendo verticais, perpendiculares ao fundo, num dos lados, e em rampa, no lado oposto, com topos arredondados, estreitos e fundos em planalto largo. Distância topo-fundo de 294 μm .

Os implantes dos grupos 1 e 3 têm a mesma macroestrutura mas tratamentos de superfície diferentes, o mesmo sucedendo entre os implantes dos grupos 2 e 6. Os implantes dos grupos 1 e 2 têm o mesmo tratamento de superfície mas macroestruturas diferentes e os implantes dos grupos 4 e 5 têm a mesma macroestrutura e o mesmo tratamento de superfície, embora tendo sido submetidos a protocolos diferentes.

As figuras 4.2 e 4.3 mostram os aspectos microtopográficos dos seis tipos de implantes com ampliações de 100x e 500x, respectivamente.

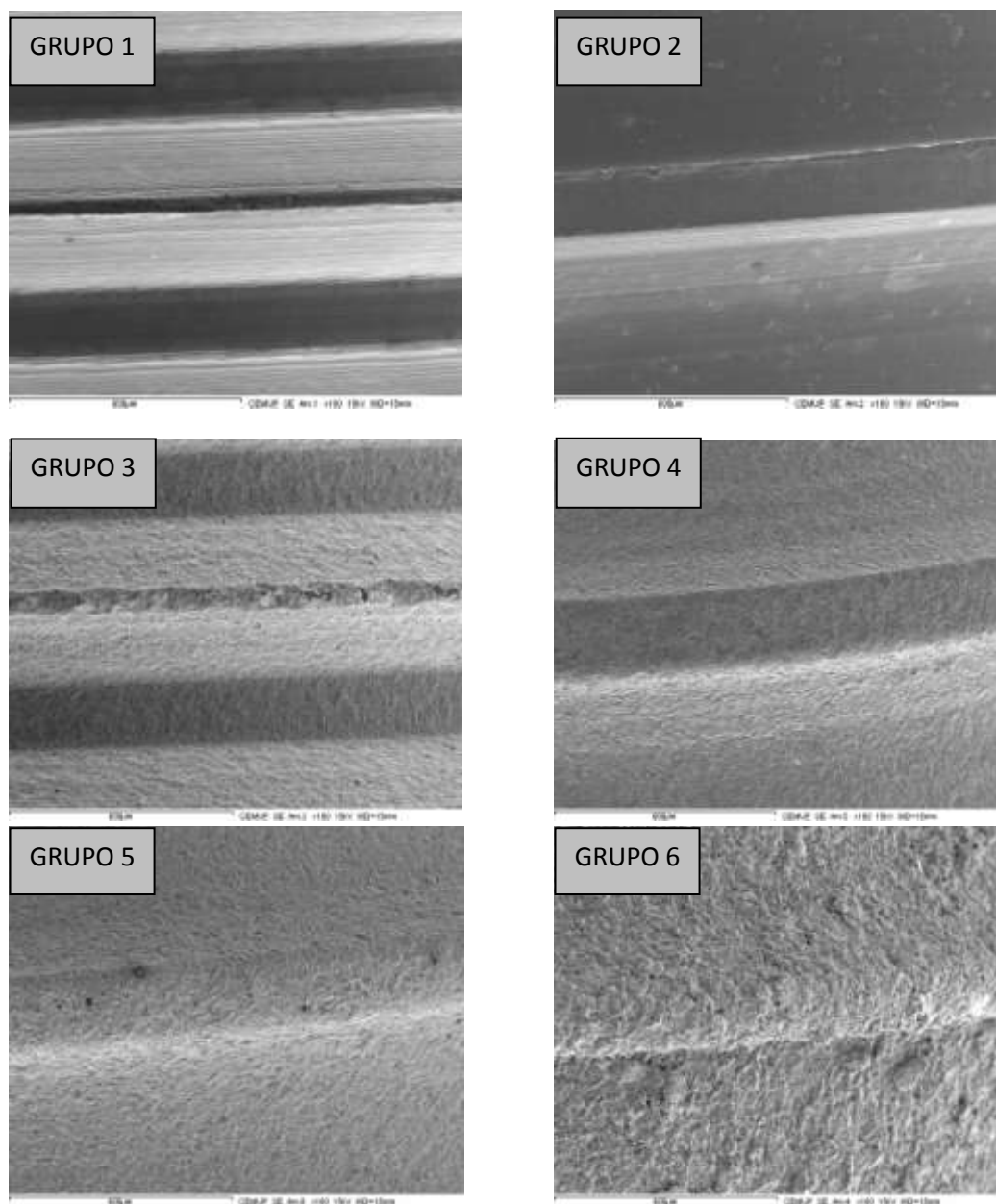


Figura 4.2 – Microtopografia dos seis grupos de implantes analisados (100x, MEV).

Com a ampliação de 100x (figura 4.2), e numa avaliação qualitativa, é possível agrupar os implantes, de acordo com a sua microtopografia de superfície, reflectindo, em certa medida, o tipo de tratamento de superfície utilizado para cada um dos grupos de implantes. Uma primeira classe, formada pelos implantes dos grupos 1 e 2 que apresentam uma superfície semelhante, formada por sulcos evidentes, paralelos entre si. Uma segunda classe constituída pelos implantes dos grupos 3, 4 e 5, que apresentam uma superfície, sem sulcos, com aspecto granulado e alguma homogeneidade. Finalmente, uma outra classe, formada apenas pelos implantes do grupo 6, que apresentam uma

superfície distinta das demais, mostrando mais irregularidades, mais grosseiras e mais evidentes, com maior número de protuberâncias e mais proeminentes.

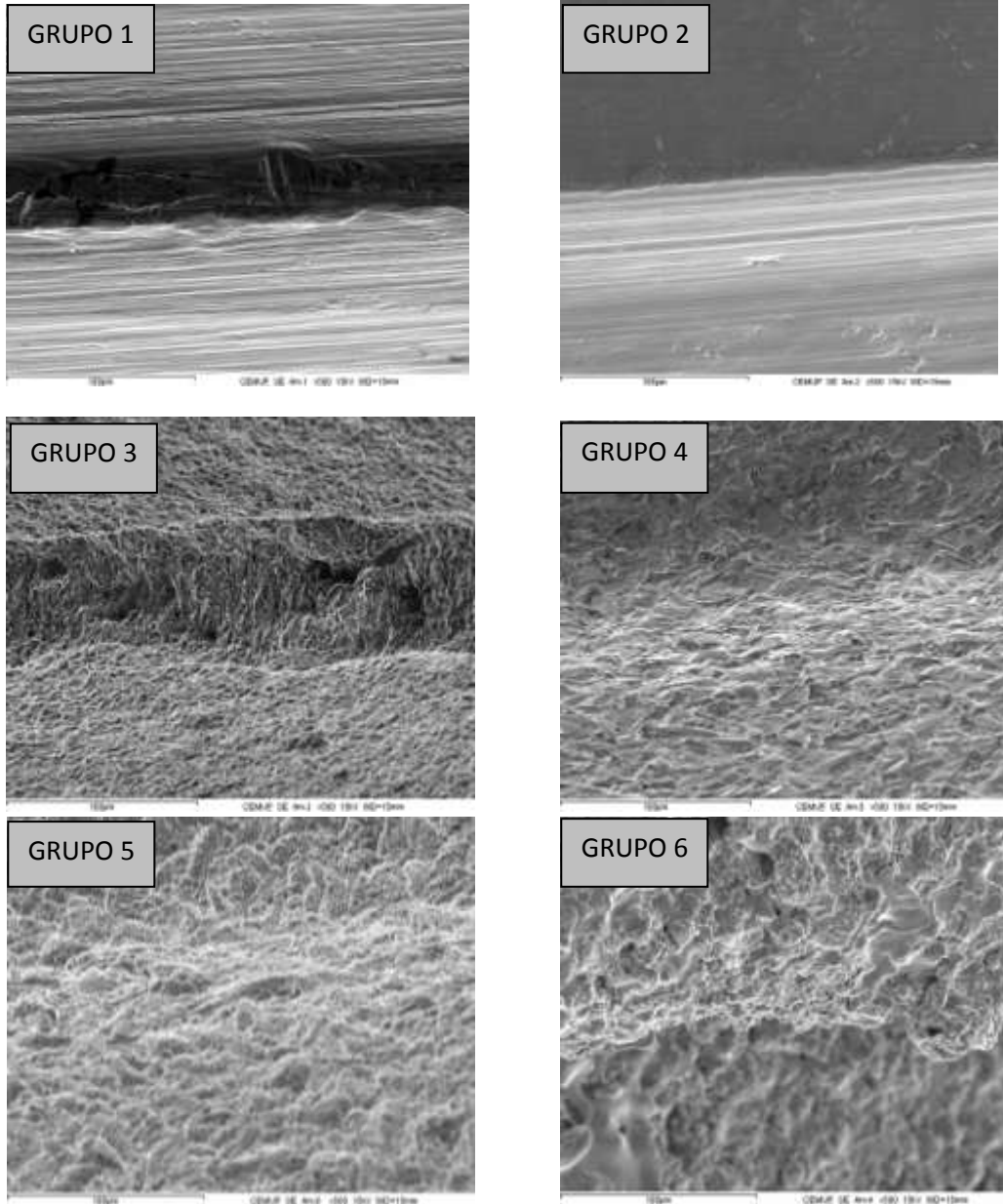


Figura 4.3 – Microtopografia dos seis grupos de implantes analisados (500x, MEV).

Com maiores ampliações, de 500x (figura 4.3), tornam-se mais evidentes as características microestruturais dos seis tipos de superfícies, sendo possível separá-las em dois tipos: uma com um padrão de irregularidades definido, denominadas anisotrópicas, formada pelos implantes dos grupos 1 e 2 e outra, com um padrão não definido, mais

homogênea, denominadas isotrópicas, constituídas pelos restantes grupos. Os implantes dos grupos 1 e 2 apresentam a superfície com numerosos sulcos estreitos e paralelos entre si. Os restantes implantes apresentam superfície irregular, com aspecto relativamente homogêneo, sendo formadas por protuberâncias e crateras evidentes, mais ou menos marcadas. O implante do grupo 6 é o que se apresenta mais irregular com proeminências mais acentuadas. Embora menos evidente, também se verifica que, apesar de semelhantes, o padrão de irregularidades não é igual para os implantes dos grupos 3, 4 e 5, submetidos ao mesmo tipo de tratamento de superfície.

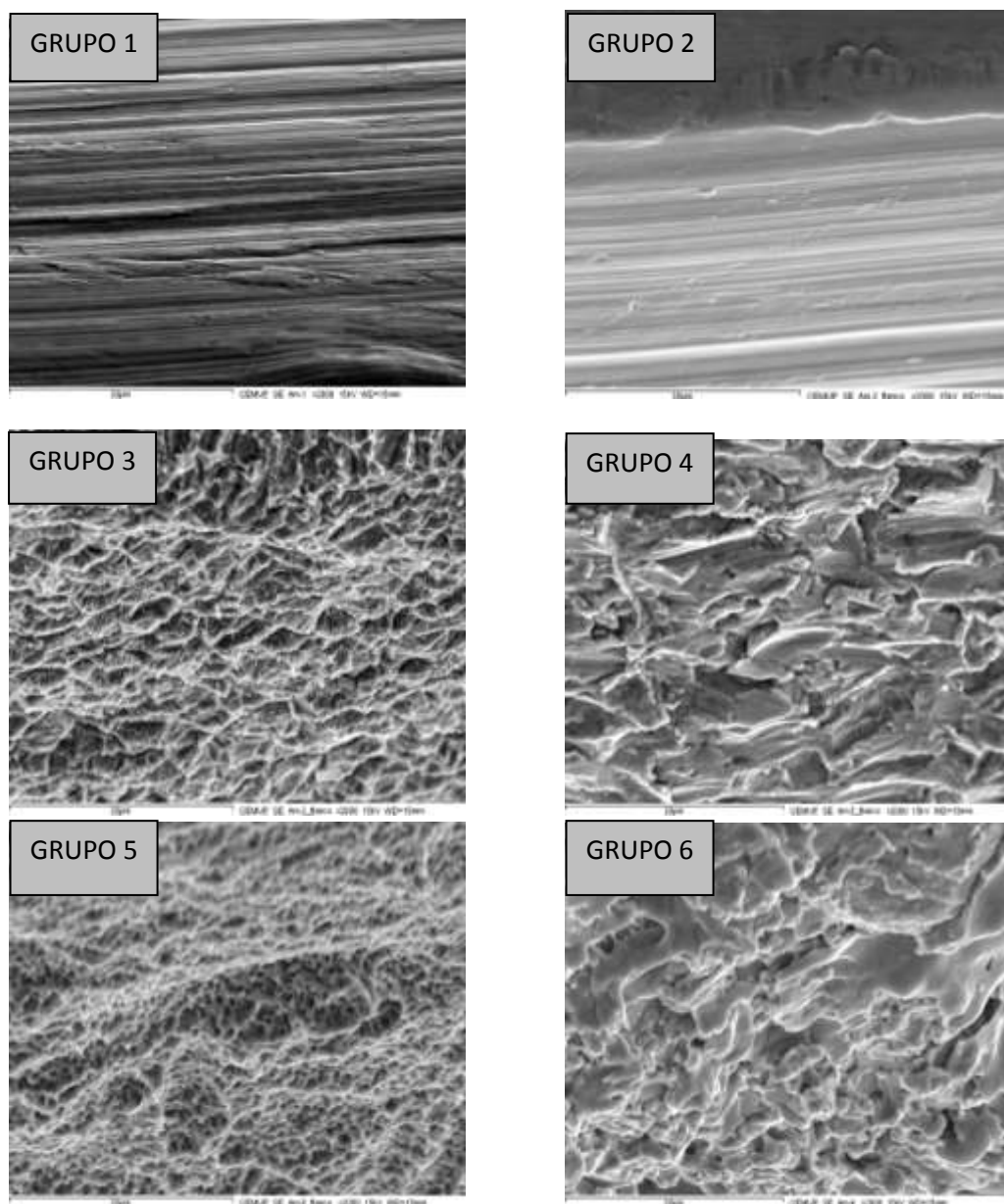


Figura 4.4 – Microtopografia dos seis grupos de implantes analisados (2.000x, MEV).

Com ampliações maiores, de 2.000x (figura 4.4), é possível observar, com muito detalhe, o acabamento de cada uma das seis superfícies e verificar diferenças qualitativas, mais ou menos significativas, entre todos eles.

Implantes maquinados (grupos 1 e 2) – Apresentam sulcos evidentes afastados, entre si, por alguns nanómetros, com orientação bem definida, e paralelos entre si. Resultam da forma como é realizado o corte dos implantes a partir de cilindros de titânio, não sendo submetidos, posteriormente, a nenhum tipo de acabamento específico, susceptível de atenuar ou mesmo eliminar estas irregularidades. Estes sulcos são pouco profundos. Com maiores ampliações e, num ou noutro local, observam-se pequenas crateras ou proeminências, arredondadas ou ovaladas, correspondentes a defeitos, comuns neste tipo de superfície e resultantes das limitações do processo de maquinação. De uma forma geral, estas superfícies apresentam-se com irregularidades com uma orientação bem definida, sendo esta característica típica de superfícies anisotrópicas. O implante do grupo 1 apresenta, aparentemente, maior número de sulcos do que o implante do grupo 2, embora as superfícies sejam muito semelhantes, numa observação menos pormenorizada.

Implantes submetidos a jactamento e ataque ácido (grupos 3, 4 e 5) – A observação dos implantes pertencentes a estes três grupos, revela diferenças qualitativas, entre eles, apesar de submetidos ao mesmo tipo de tratamento de superfície, que são mais evidentes com maiores ampliações. Todos eles apresentam irregularidades do tipo fossa ou depressão/elevação, mais ou menos marcadas. No caso dos implantes dos grupos 3 e 5 essas irregularidades fazem lembrar um favo de mel. As depressões são mais marcadas nos implantes do grupo 3, apresentando os implantes do grupo 5, cavidades mais pequenas e mais homogeneamente distribuídas. Os implantes do grupo 4 apresentam-se como os mais irregulares, destes três, com protuberâncias muito grandes, do tipo lasca ou apara de chocolate.

Implante revestido por *spray* de plasma de titânio (TPS) (grupo 6) – Observa-se uma superfície extremamente heterogénea, com irregularidades bastante acentuadas. É formada por cavidades grandes e mais ou menos profundas, com protuberâncias globulares, de aspecto arredondado e dimensões variáveis, bastante evidentes, colocadas lado a lado e sobrepostas. Estas correspondem ao plasma de titânio projectado, sobre a superfície, a velocidades e temperaturas elevadas. Têm o aspecto típico de metal que se solidificou à superfície, por arrefecimento. São perceptíveis várias camadas de material, dispostas umas sobre as outras. Esta superfície caracteriza-se por ser bastante heterogénea, não apresentando as irregularidades uma orientação definida.

1.1.2 Perfil 3D dos implantes

As figuras 4.5 a 4.10 representam a imagem tridimensional (3D) de um implante pertencente a cada um dos grupos analisados, tendo sido obtidas com recurso a Microscopia Confocal de Varrimento Laser.

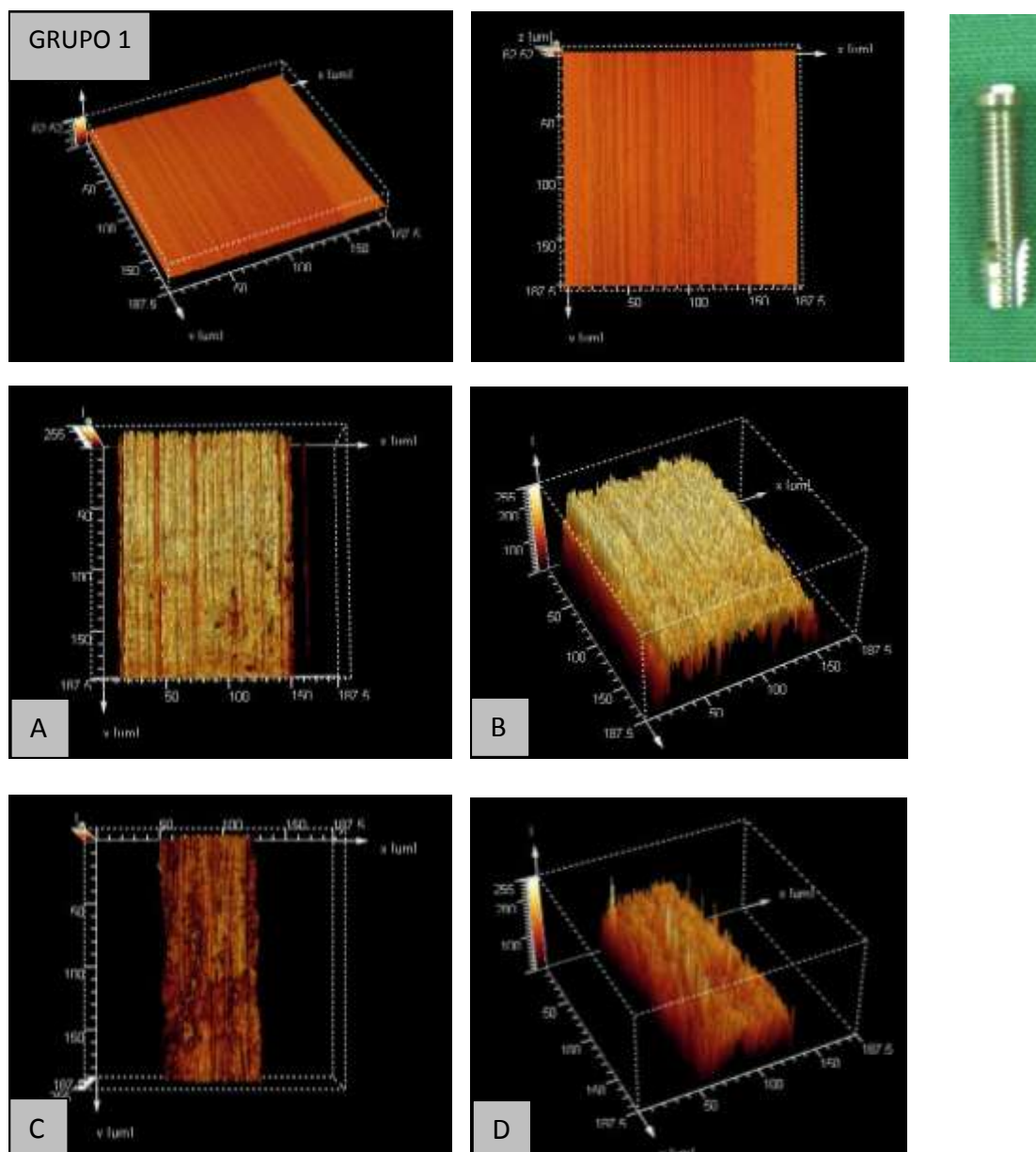


Figura 4.5 – Imagem 3D de um implante do grupo 1. A e B – Fundo; C e D – Topo.

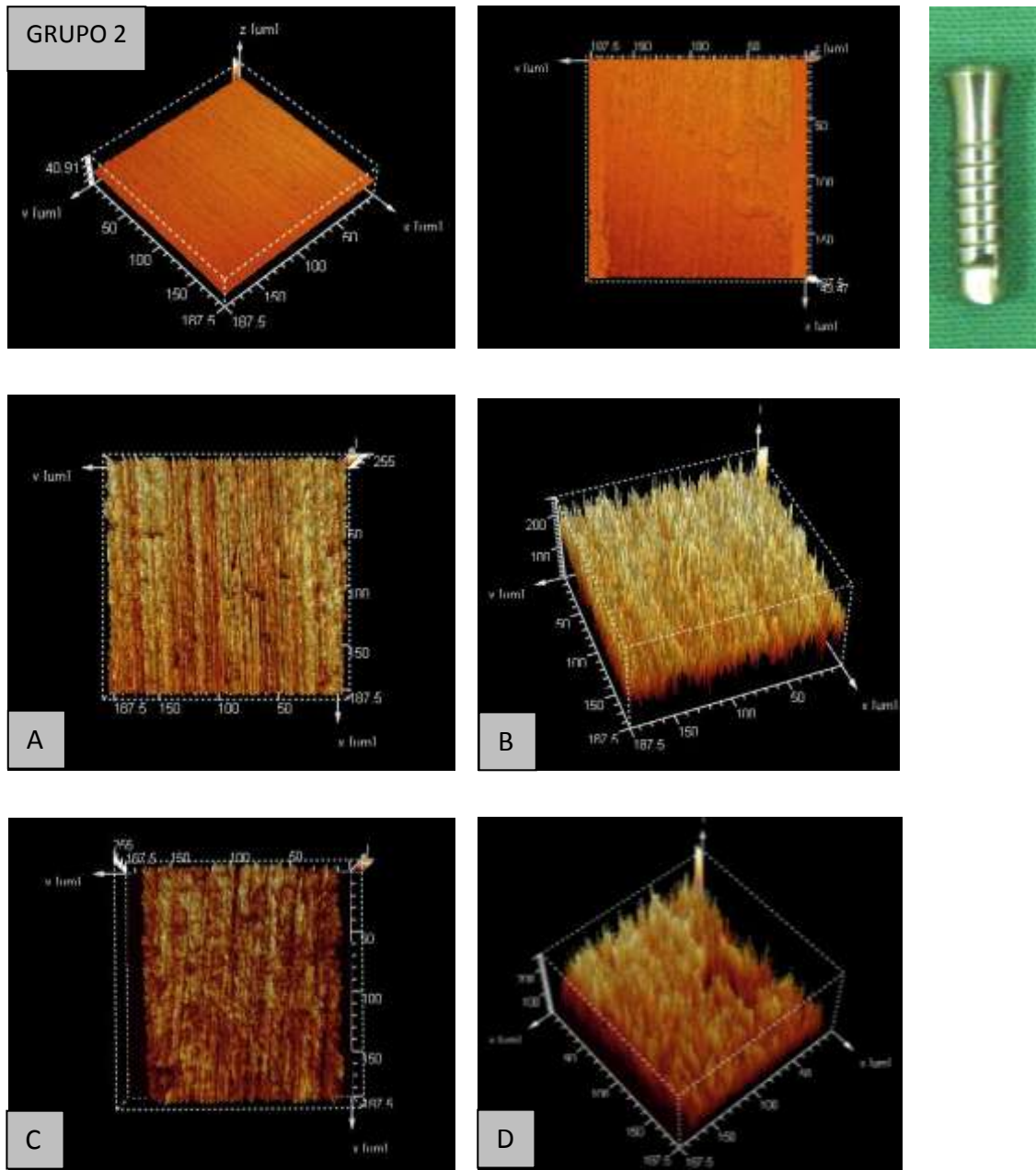


Figura 4.6 – Imagem 3D de um implante do grupo 2. A e B – Fundo; C e D – Topo.

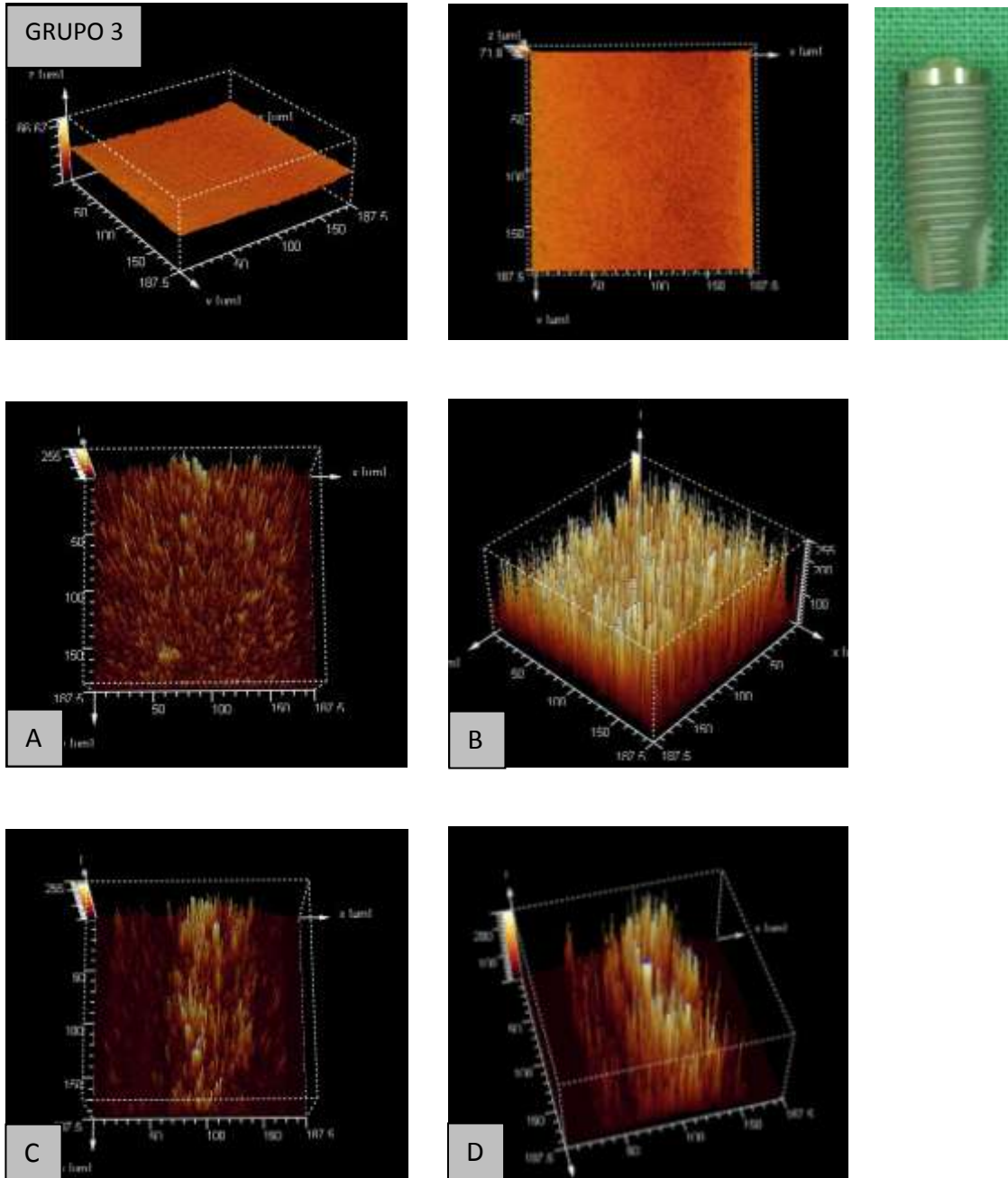


Figura 4.7 – Imagem 3D de um implante do grupo 3. A e B – Fundo; C e D – Topo.

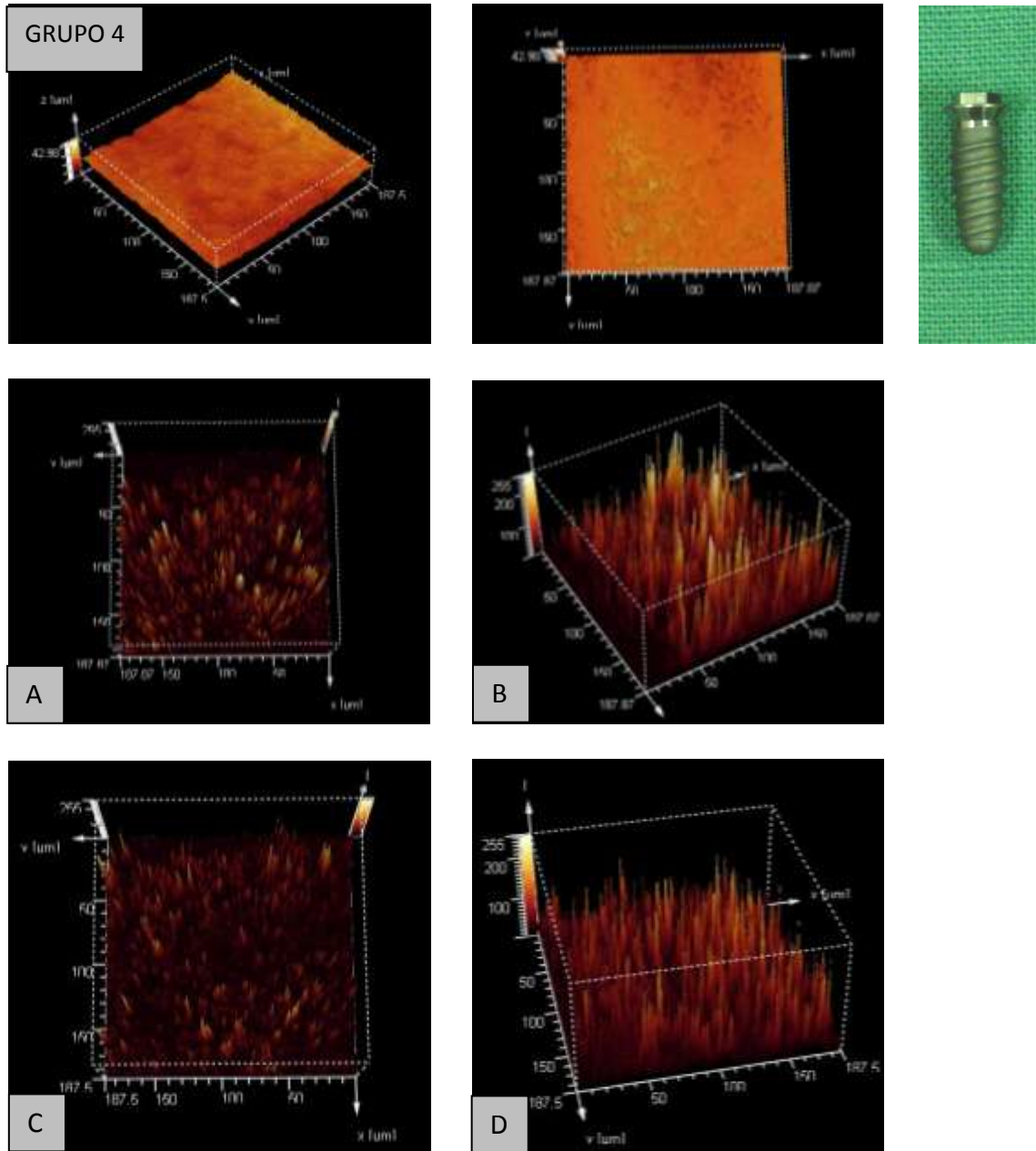


Figura 4.8 – Imagem 3D de um implante do grupo 4. A e B – Fundo; C e D – Topo.

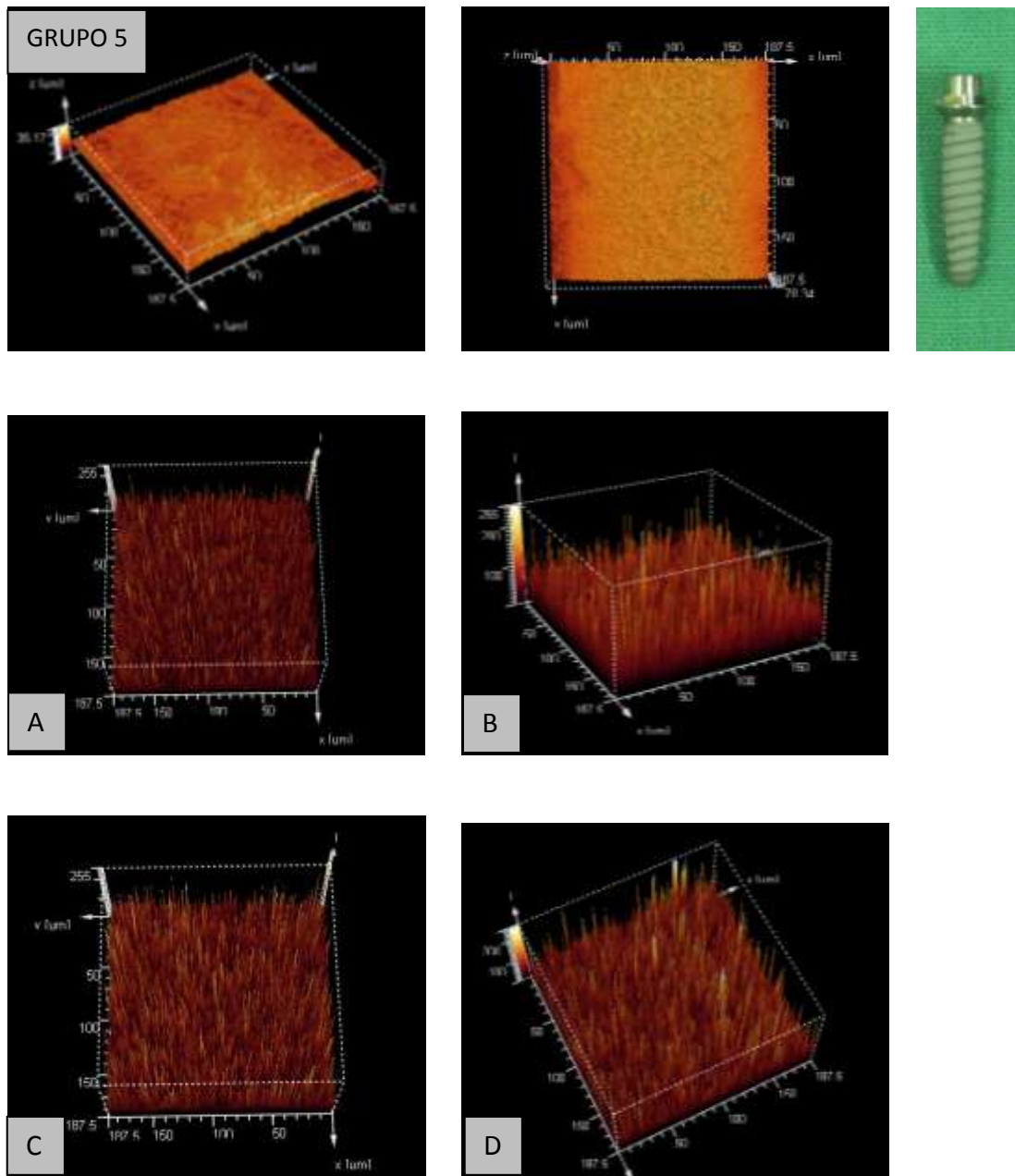


Figura 4.9 – Imagem 3D de um implante do grupo 5. A e B – Fundo; C e D – Topo.

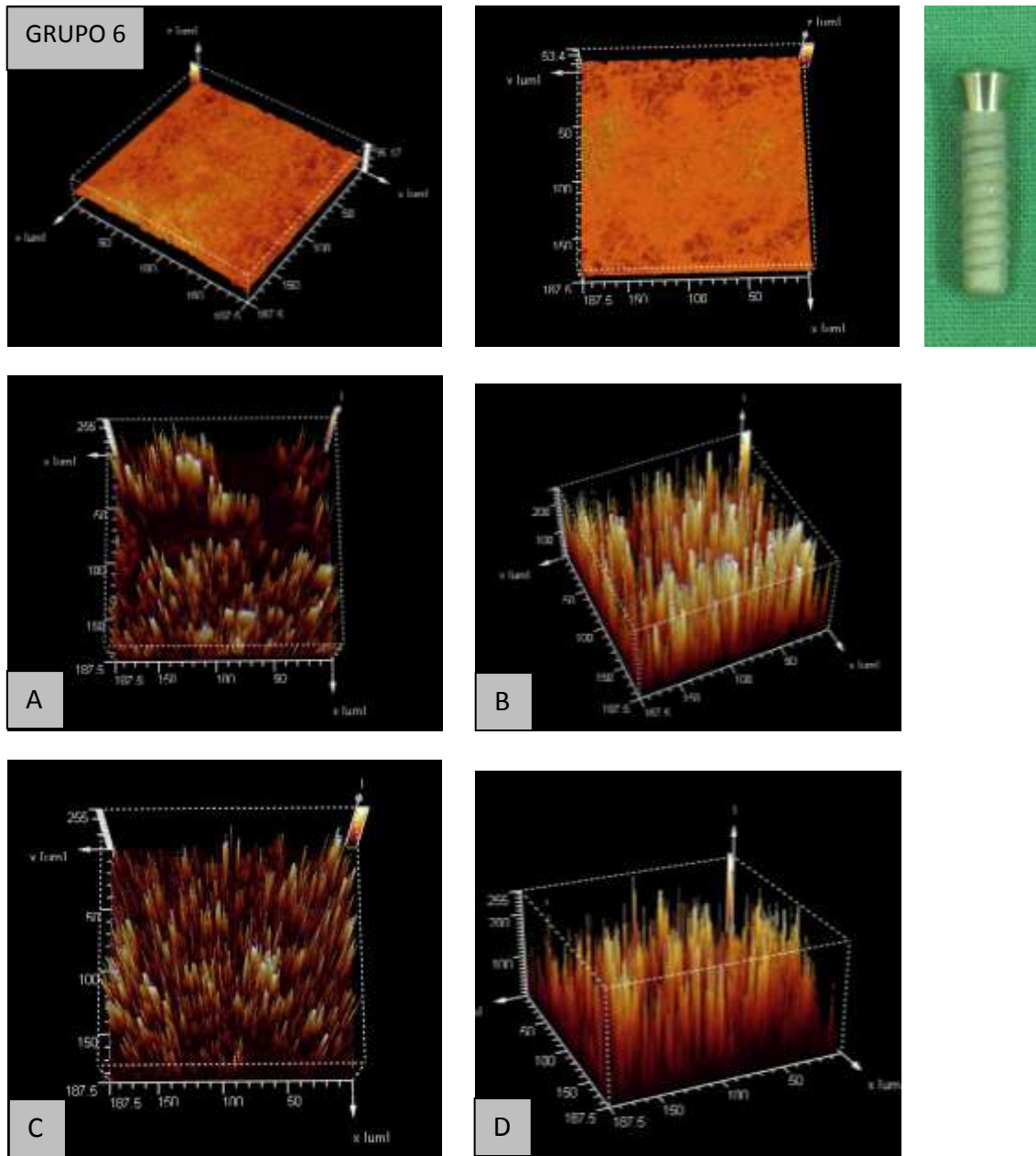


Figura 4.10 – Imagem 3D de um implante do grupo 6. A e B – Fundo; C e D – Topo.

A análise das imagens tridimensionais, obtidas a partir dos seis implantes estudados, confirma as observações efectuadas com recurso à Microscopia Electrónica de Varrimento. Os implantes dos grupos 1 e 2 apresentam irregularidades lineares, do tipo sulco, paralelas entre si, com orientação definida. Os restantes grupos apresentam superfícies contendo irregularidades do tipo protuberância e cratera, mais ou menos evidentes, sem uma orientação definida. Os implantes do grupo 6 surgem com protuberâncias e depressões mais marcadas do que as dos demais implantes, o que

origina um padrão com irregularidades mais grosseiras. Dos três grupos formados por implantes submetidos a jacteamento e ataque ácido, grupos 3, 4 e 5, é perceptível, através destas imagens, a maior discrepância das irregularidades no grupo 4, comparativamente com os grupos 3 e 5, embora menos acentuadas do que as apresentadas pelo grupo 6.

1.1.3 Rugosidade das superfícies

Diversos parâmetros de rugosidade foram medidos para as seis superfícies, com base na metodologia contactante, utilizando um profilômetro mecânico. Foram determinados o R_a , o R_z , o $R_{máx}$, o R_{Sm} , o R_{Sk} e o R_{ku} . Os resultados obtidos tiveram por base, a análise de nove implantes pertencentes a cada um dos seis grupos estudados.

1.1.3.1 Profilometria mecânica

Os gráficos 4.1 a 4.6 representam exemplos do perfil, obtido por profilometria mecânica, de cada um dos grupos de implantes estudados.

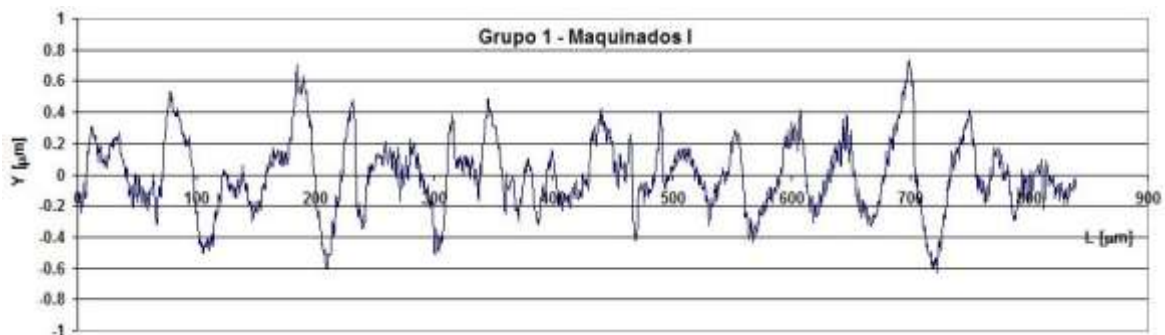


Gráfico 4.1 – Perfil de um implante do grupo 1, maquinado I.

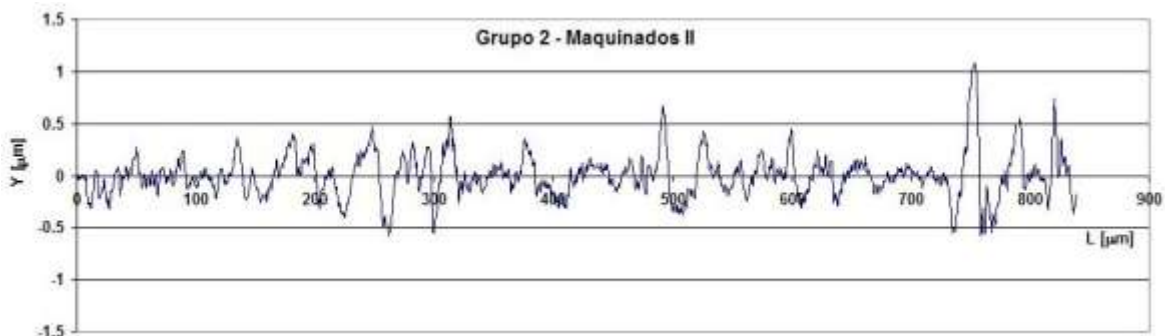


Gráfico 4.2 – Perfil de um implante do grupo 2, maquinado II.

Capítulo IV – Resultados

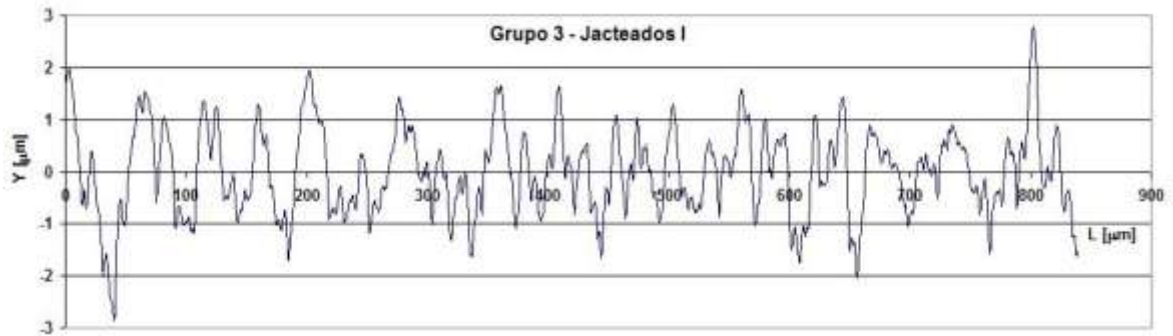


Gráfico 4.3 – Perfil de um implante do grupo 3, jacteamto e ataque ácido I.

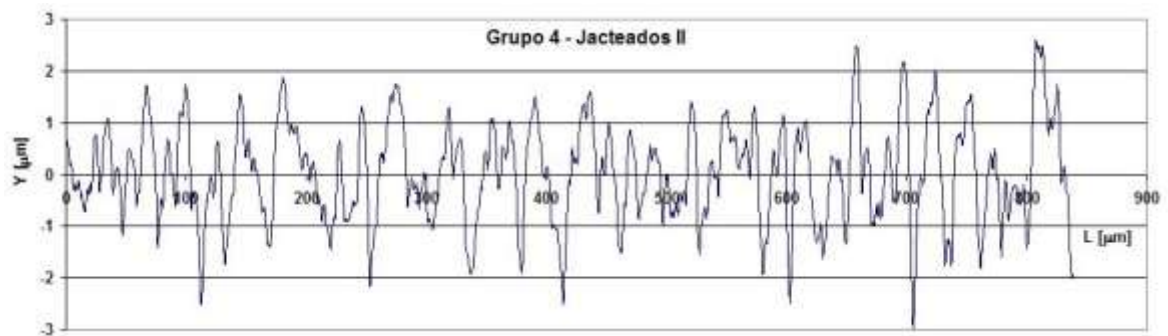


Gráfico 4.4 – Perfil de um implante do grupo 4, jacteamto e ataque ácido II.

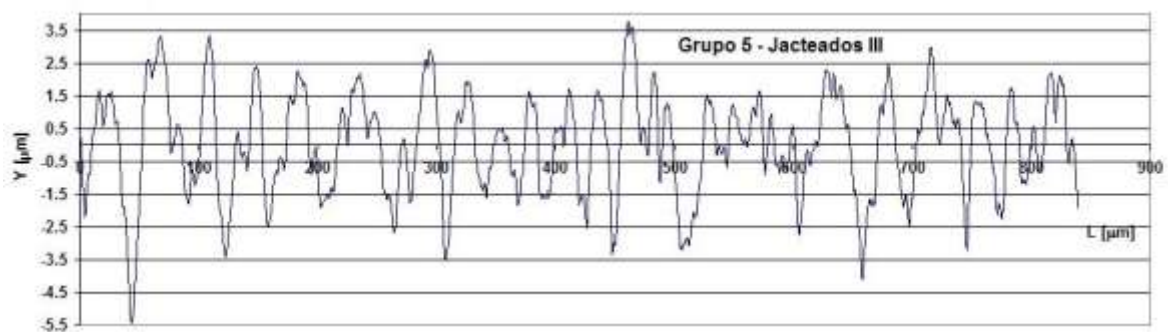


Gráfico 4.5 – Perfil de um implante do grupo 5, jacteamto e ataque ácido III.

Capítulo IV - Resultados

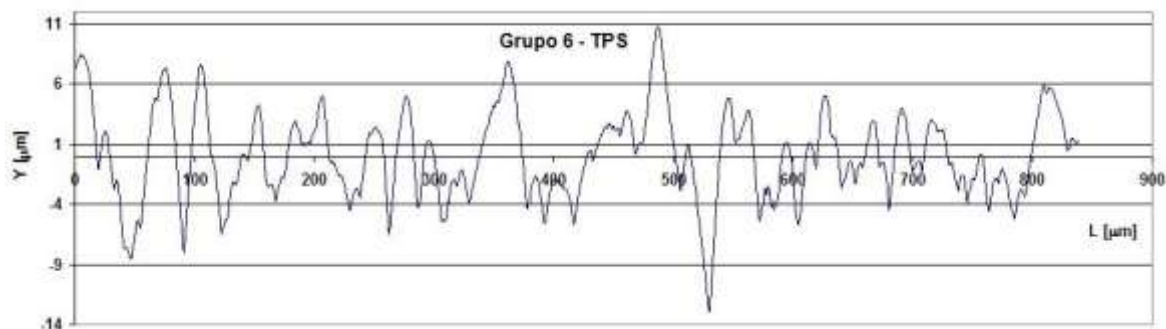


Gráfico 4.6 – Perfil de um implante do grupo 6, revestidos por *spray* de plasma de titânio.

Os resultados dos diferentes parâmetros de rugosidade analisados, correspondentes a cada um dos seis grupos de implantes estudados, estão expressos na tabela 4.1 e mais detalhadamente no anexo 1.

Parâmetros de rugosidade	R_a	R_z	$R_{m\acute{a}x}$	R_{sm}	R_{sk}	R_{ku}
Grupos						
1	0,18 ± 0,04	1,15 ± 0,28	1,87 ± 0,81	0,04 ± 0,01	0,39	6,61
2	0,26 ± 0,06	1,86 ± 0,40	3,04 ± 0,88	0,03 ± 0,00	1,16	9,36
3	0,73 ± 0,07	4,14 ± 0,43	5,39 ± 0,99	0,03 ± 0,00	-0,10	3,16
4	0,80 ± 0,08	4,97 ± 0,68	6,25 ± 1,29	0,02 ± 0,01	-0,11	3,27
5	1,21 ± 0,15	7,08 ± 0,77	9,03 ± 1,71	0,03 ± 0,00	-0,22	3,34
6	2,52 ± 0,24	13,67 ± 1,22	17,12 ± 1,35	0,04 ± 0,00	-0,22	3,04

R_a - média aritmética dos valores absolutos de afastamento dos pontos do perfil analisado, em relação à linha média, considerando a superfície analisada; R_z - média aritmética das 5 maiores distâncias topo-fundo, presentes na superfície analisada; $R_{m\acute{a}x}$ - maior distância topo-fundo na superfície analisada; R_{sm} - distância média entre irregularidades, no plano horizontal, considerando a superfície analisada; R_{sk} - análise da simetria do perfil analisado, em relação a uma linha média. $R_{sk}=0$ - perfil simétrico. $R_{sk}>0$ - predomínio de topos. $R_{sk}<0$ - predomínio de fundos; R_{ku} - grau de irregularidades do perfil, analisando a presença, ou não, de irregularidades extremas. $R_{ku}>3$ - perfil com irregularidades muito marcadas. $R_{ku}<3$ - perfil com irregularidades pouco marcadas, esbatidas.

Tabela 4.1 – Valores obtidos, por profilometria mecânica, para os diferentes parâmetros de rugosidade analisados (valores expressos em μm).

A média obtida de R_a foi de 0,18 μm , com um desvio-padrão de 0,04 μm , para o grupo 1; 0,26 μm , com um desvio-padrão de 0,06 μm , para o grupo 2; 0,73 μm , com um desvio-padrão de 0,07 μm , para o grupo 3; 0,80 μm , com um desvio-padrão de 0,08 μm , para o grupo 4; 1,21 μm , com um desvio-padrão de 0,15 μm , para o grupo 5 e 2,52 μm , com um desvio-padrão de 0,24 μm , para o grupo 6. Os valores médios de R_a variaram entre 0,18 μm e 0,26 μm para os implantes maquinados. A média de R_a variou entre 0,73 μm e 1,21 μm para os implantes submetidos a jactamento e ataque ácido. Para o conjunto dos seis grupos analisados, os valores médios variaram entre 0,18 μm do grupo 1 e os 2,52 μm do grupo 6.

A média de R_z obtida para o grupo 1 foi de 1,15 μm , com um desvio-padrão de 0,28 μm . Para o grupo 2 foi de 1,86 μm , com um desvio-padrão de 0,40 μm . Para o grupo 3 foi de 4,14 μm , com um desvio-padrão de 0,43 μm . Para o grupo 4 foi de 4,97 μm , com um desvio-padrão de 0,68 μm . Para o grupo 5 foi de 7,08 μm , com um desvio-padrão de 0,77 μm e, finalmente, para o grupo 6 foi encontrado um valor médio de 13,67 μm , com um desvio-padrão de 1,22 μm . Os valores médios de R_z variaram entre um mínimo de 1,15 μm , com um desvio-padrão de 0,28 μm , obtido no grupo 1, e um máximo de 13,67 μm , com um desvio-padrão de 1,22 μm , obtido para o grupo 6.

Os valores médios de $R_{m\acute{a}x}$ obtidos para os diferentes grupos de implantes, foram superiores aos correspondentes R_z , uma vez que se trata do valor máximo topo-fundo e não de uma média de valores, como sucede com o R_z . No grupo 1 foi encontrado um valor médio de R_z de 1,87 μm , com um desvio-padrão de 0,81 μm ; no grupo 2 foi obtido um valor médio de 3,04 μm , com um desvio-padrão de 0,88 μm ; no grupo 3 o valor médio observado foi de 5,39 μm , com um desvio-padrão de 0,99 μm ; no grupo 4 o valor médio foi de 6,25 μm , com um desvio-padrão de 1,29 μm ; no grupo 5, o valor médio obtido foi de 9,03 μm , com um desvio-padrão de 1,71 μm e, no grupo 6, foi de 17,12 μm , com um desvio-padrão de 1,35 μm . Foram observados valores médios de R_z que variaram entre um mínimo de 1,87 μm , com um desvio-padrão de 0,81 μm , no grupo 1 e um máximo de 17,12 μm , com um desvio-padrão de 1,35 μm , no grupo 6.

A média obtida de R_{Sm} foi de 0,04 μm , com um desvio-padrão de 0,01 μm , para o grupo 1; 0,03 μm , com um desvio-padrão de 0,00 μm , para o grupo 2; 0,03 μm , com um desvio-padrão de 0,00 μm , para o grupo 3; 0,02 μm , com um desvio-padrão de 0,01 μm , para o grupo 4; 0,03 μm , com um desvio-padrão de 0,00 μm , para o grupo 5 e 0,04 μm , com um desvio-padrão de 0,00 μm , para o grupo 6.

O valor obtido para o R_{Sk} foi de 0,39 μm para o grupo 1; 1,16 μm para o grupo 2; -0,10 μm para o grupo 3; -0,11 μm para o grupo 4 e -0,22 μm para os grupos 5 e 6.

Capítulo IV - Resultados

O valor obtido para o R_{Ku} foi de 6,61 μm para o grupo 1; 9,36 μm para o grupo 2; 3,16 μm para o grupo 3; 3,27 μm para o grupo 4, 3,34 para o grupo 5 e 3,04 μm para o grupo 6.

Na tabela 4.2 estão referidos os valores mínimos, máximos, a média e o desvio-padrão do R_a , obtidos para cada uma das localizações analisadas, por grupo de implantes (para informação mais detalhada, consultar o anexo 2).

Grupos	Parâmetro de rugosidade	R_a			
		Mínimo	Máximo	MÉDIA	MÉDIA GLOBAL
1	Chanfro	0,13	0,24	0,18 ± 0,04	0,18 ± 0,04
2	Chanfro	0,15	0,55	0,31 ± 0,12	0,26 ± 0,06
	Chanfro transversal	0,31	0,51	0,40 ± 0,06	
	Fundo da espira	0,07	0,14	0,11 ± 0,02	
	Ponta	0,14	0,31	0,24 ± 0,06	
3	Chanfro	0,63	0,85	0,74 ± 0,07	0,73 ± 0,07
	Chanfro transversal	0,60	0,93	0,73 ± 0,09	
4	Fundo da espira	0,66	0,91	0,80 ± 0,08	0,80 ± 0,08
5	Fundo da espira	1,03	1,47	1,21 ± 0,15	1,21 ± 0,15
6	Chanfro	2,45	3,66	2,80 ± 0,40	2,52 ± 0,24
	Chanfro transversal	1,92	2,98	2,52 ± 0,37	
	Fundo da espira	1,07	3,29	2,40 ± 0,80	
	Ponta	2,14	2,80	2,37 ± 0,21	

Tabela 4.2 – Valores obtidos, por profilometria mecânica, para a rugosidade média (R_a), em função da zona analisada (valores expressos em μm).

Os implantes dos grupos 1, 4 e 5 foram analisados em uma das quatro localizações possíveis, em virtude das suas características. No grupo 1 foi registada a rugosidade no chanfro, enquanto que, nos grupos 4 e 5 a medição foi efectuada no fundo das espiras. No caso do grupo 3 foram feitos registos a partir de duas localizações, o chanfro e o

chanfro transversal. Os implantes dos grupos 2 e 6, devido ao afastamento das espiras, permitiram a avaliação da rugosidade em quatro localizações distintas. Os valores obtidos para o grupo 1 variaram entre um mínimo de $0,13 \mu\text{m}$ e um máximo de $0,24 \mu\text{m}$, com um valor médio de $0,18 \mu\text{m} \pm 0,04 \mu\text{m}$. Como só foi efectuada esta medição, a média global de R_a , para este grupo, foi igual, isto é, $0,18 \mu\text{m} \pm 0,04 \mu\text{m}$. Para o grupo 2, ao nível do chanfro, os valores obtidos variaram entre um mínimo de $0,15 \mu\text{m}$ e um máximo de $0,55 \mu\text{m}$, com um valor médio de $0,31 \mu\text{m} \pm 0,12 \mu\text{m}$. No chanfro transversal os valores variaram entre um mínimo de $0,31 \mu\text{m}$ e um máximo de $0,51 \mu\text{m}$, com um valor médio de $0,40 \mu\text{m} \pm 0,06 \mu\text{m}$. Ao nível do fundo da espira os valores variaram entre um mínimo de $0,07 \mu\text{m}$ e um máximo de $0,14 \mu\text{m}$, com um valor médio de $0,11 \mu\text{m} \pm 0,02 \mu\text{m}$. Na ponta, os valores variaram entre um mínimo de $0,14 \mu\text{m}$ e um valor máximo de $0,31 \mu\text{m}$, com um valor médio de $0,24 \mu\text{m} \pm 0,06 \mu\text{m}$. A média global, resultando das medições efectuadas nas quatro localizações, foi de $0,26 \mu\text{m} \pm 0,06 \mu\text{m}$. Para o grupo 3, ao nível do chanfro, os valores obtidos variaram entre um mínimo de $0,63 \mu\text{m}$ e um máximo de $0,85 \mu\text{m}$, com um valor médio de $0,74 \mu\text{m} \pm 0,07 \mu\text{m}$. No chanfro transversal os valores variaram entre um mínimo de $0,60 \mu\text{m}$ e um máximo de $0,93 \mu\text{m}$, com um valor médio de $0,73 \mu\text{m} \pm 0,09 \mu\text{m}$. A média global, resultando das medições efectuadas nestas duas localizações, foi de $0,73 \mu\text{m} \pm 0,07 \mu\text{m}$. Para o grupo 4 foi registada a rugosidade no fundo da espira, variando os valores obtidos, entre um mínimo de $0,66 \mu\text{m}$ e um valor máximo de $0,91 \mu\text{m}$, com um valor médio de $0,80 \mu\text{m} \pm 0,08 \mu\text{m}$. Como as medidas foram efectuadas somente nesta localização, a média global de R_a , para este grupo, foi igual, isto é, $0,80 \mu\text{m} \pm 0,08 \mu\text{m}$. Para o grupo 5 também foi registada a rugosidade numa só localização, na zona do fundo das espiras. Os valores obtidos variaram entre um mínimo de $1,03 \mu\text{m}$ e um valor máximo de $1,47 \mu\text{m}$, sendo o valor médio de $1,21 \mu\text{m} \pm 0,15 \mu\text{m}$. A média global deste grupo é igual, por só terem sido feitas medições nesta localização. No grupo 6, à semelhança do verificado no grupo 2, foram efectuados registos nas quatro localizações possíveis. Ao nível do chanfro os valores obtidos variaram entre um mínimo de $2,45 \mu\text{m}$ e um máximo de $3,66 \mu\text{m}$, com um valor médio de $2,80 \mu\text{m} \pm 0,40 \mu\text{m}$. No chanfro transversal os valores variaram entre um mínimo de $1,92 \mu\text{m}$ e um máximo de $2,98 \mu\text{m}$, com um valor médio de $2,52 \mu\text{m} \pm 0,37 \mu\text{m}$. Ao nível do fundo da espira os valores variaram entre um mínimo de $1,07 \mu\text{m}$ e um máximo de $3,29 \mu\text{m}$, com um valor médio de $2,40 \mu\text{m} \pm 0,80 \mu\text{m}$. Na ponta, os valores variaram entre um mínimo de $2,14 \mu\text{m}$ e um valor máximo de $2,80 \mu\text{m}$, com um valor médio de $2,37 \mu\text{m} \pm 0,21 \mu\text{m}$. A média global, resultando das médias das medições obtidas para cada uma das quatro localizações, foi de $2,52 \mu\text{m} \pm 0,24 \mu\text{m}$.

Da análise das tabelas 4.1 e 4.2, observam-se diferenças, entre os 6 grupos analisados, ao nível da sua rugosidade média, sendo essas diferenças mais evidentes quando consideradas superfícies com tratamento diferente. Os grupos de implantes

maquinados, como seria de esperar, são aqueles que apresentam as superfícies menos rugosas (Grupo 1 – R_a 0,18 μm , R_z 1,15 μm ; Grupo 2 – R_a 0,26 μm , R_z 1,86 μm), seguidos dos grupos formados por superfícies submetidas a jactamento e ataque ácido (Grupo 3 – R_a 0,73 μm , R_z 4,14 μm ; Grupo 4 – R_a 0,80 μm , R_z 4,97 μm ; Grupo 5 – R_a 1,21 μm , R_z 7,08 μm), apresentando-se o grupo dos implantes TPS como aqueles que têm a superfície mais rugosa (Grupo 6 – R_a 2,52 μm , R_z 13,67 μm). Os valores médios de R_{Sm} revelaram-se semelhantes para os seis grupos de implantes, mostrando uma certa harmonia na distância horizontal entre as irregularidades. Da análise do parâmetro R_{Sk} observa-se que os implantes apresentam um perfil grosseiramente simétrico, sem um predomínio evidente de topos em relação a fundos e vice-versa. O grupo 2, formado por implantes maquinados, revelou-se a única exceção, em que o valor positivo para este parâmetro mostra uma tendência para o predomínio de topos em relação a fundos. Apesar disso, os valores negativos encontrados para os implantes submetidos a tratamento de superfície sugere um ligeiro predomínio de fundos relativamente aos topos. Para os valores de R_{Ku} verificam-se valores muito próximos de 3 para os implantes submetidos a tratamento de superfície, demonstrativo da presença de poucas irregularidades extremas. No caso dos implantes dos grupos 1 e particularmente os do grupo 2 os valores superiores a 3 sugerem a existência de algumas irregularidades extremas.

O gráfico 4.7 mostra a distribuição dos valores de R_a obtidos para cada um dos grupos de implantes analisados (para informação mais detalhada, consultar o anexo 1).

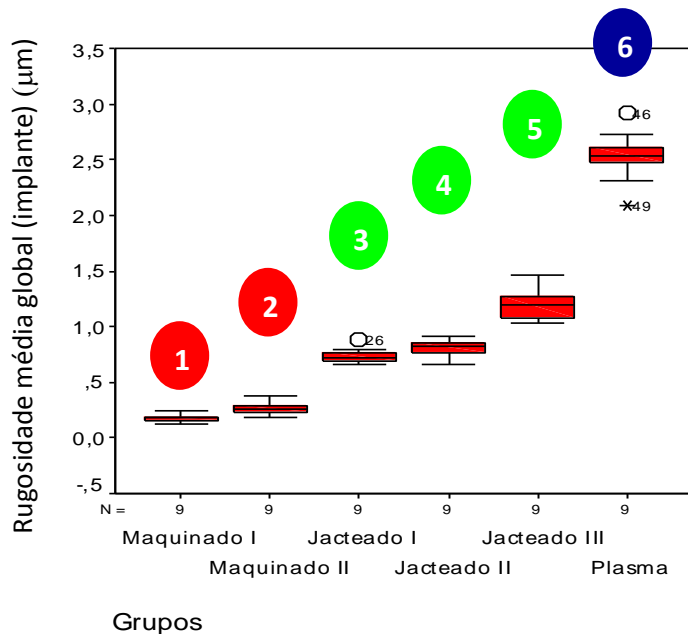


Gráfico 4.7 – Distribuição de extremos e quartis de R_a média global (implante), obtidos para os seis grupos de implantes.

A distribuição de R_a obtida nos implantes dos grupos 1 e 2, ambos formados por implantes maquinados, é semelhante, com um valor de mediana ligeiramente superior no grupo 2. Os grupos 3 e 4, formados por implantes submetidos a jacteamto e ataque ácido, apresentaram igualmente, valores de mediana sobreponíveis, sendo o valor obtido para o grupo 5, com o mesmo tipo de superfície, um pouco superior. O grupo 6, formado por implantes TPS apresentou valores de mediana substancialmente superiores.

O gráfico 4.8 mostra, com base nas amostras estudadas, as estimativas da rugosidade média, para um intervalo de confiança a 95%, nos seis grupos de implantes (para informação mais detalhada, consultar o anexo 1).

A projecção dos intervalos de confiança sugere a existência de três classes no universo dos implantes estudados. A divisão sugerida pelos valores obtidos é concordante com a divisão dos grupos, por classes, de acordo com o tipo de tratamento de superfície realizado, conforme já referido anteriormente.

Estimativa de rugosidade média

Intervalos de confiança (0,95)

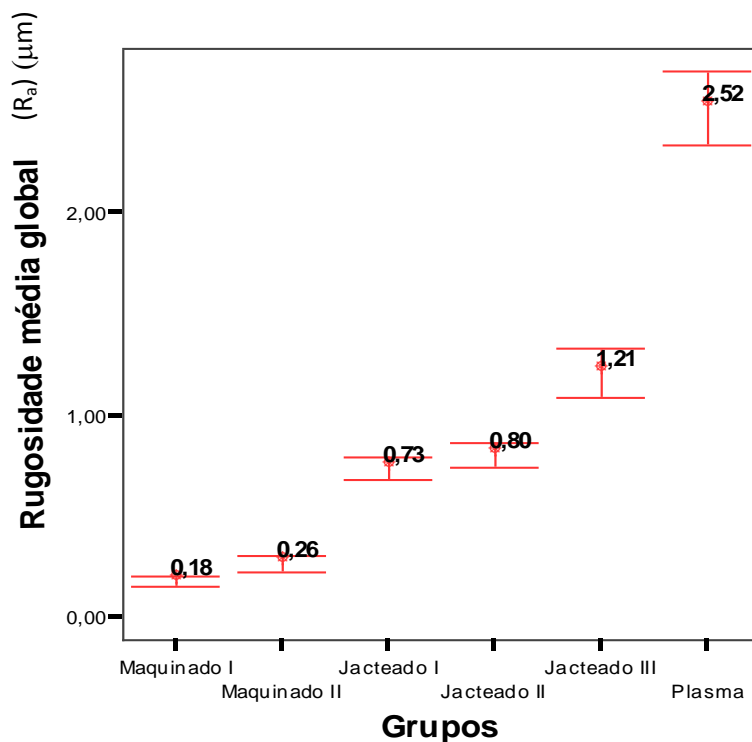


Gráfico 4.8 – Estimativa da rugosidade média, para cada um dos seis grupos de implantes, para um intervalo de confiança a 95%

Com vista a comparar a rugosidade média (R_a) obtida para cada um dos seis grupos analisados, procurando verificar a existência de diferenças, entre eles, foram realizadas provas não paramétricas, em função do tamanho da amostra. Foi realizado o teste Kruskal-Wallis, tendo sido constatada a existência de grupos com significância estatística ($p < 0,001$) (para informação mais detalhada, consultar o anexo 3).

Com base nesta constatação e tendo como objectivo a comparação dos grupos e na procura de onde residiam tais diferenças, foram realizados testes uni-laterais, com recurso ao teste U-Mann Whitney. O resumo dos resultados está representado na tabela 4.3.

Grupos	Grupos				
	2	3	4	5	6
1	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$
2		$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$
3			$p > 0,1$	$p < 0,01$	$p < 0,01$
4				$p < 0,01$	$p < 0,01$
5					$p < 0,01$

Tabela 4.3 – Significância estatística para a comparação de valores de rugosidade média, entre grupos, com recurso ao teste U-Mann Whitney, uni-lateral (valores corrigidos em função do número de comparações efectuadas).

O teste U-Mann Whitney, uni-lateral, mostra existirem diferenças, com significado estatístico, para $p < 0,01$, entre o grupo 1 e todos os outros, sendo o seu R_a médio menor do que o de todos os outros grupos. Foram também observadas diferenças com significado estatístico, para $p < 0,01$, entre o grupo 2 e todos os outros grupos, sendo o R_a médio deste grupo, maior do que o do grupo 1 mas menor do que o dos restantes grupos. Os grupos 3 e 4 não apresentaram diferenças entre si, tendo sido observadas diferenças, com significado, para $p < 0,01$, entre estes dois grupos e os restantes, sendo os seus valores superiores ao dos grupos 1 e 2, mas inferiores ao dos grupos 5 e 6. Os valores de R_a médio do grupo 5 apresentaram diferenças com significado, para $p < 0,01$, relativamente aos demais grupos, tendo esse valor sido maior do que os observados para os grupos 1, 2, 3 e 4 e menor do que o apresentado pelo grupo 6. Os valores encontrados para o grupo 6 foram maiores do que os dos demais grupos, para $p < 0,01$ (para informação mais detalhada, consultar o anexo 4).

Nos implantes dos grupos 2 e 6, devido às suas características macroestruturais, foi possível efectuar medições de rugosidade, em quatro localizações distintas, com base no facto de Wennerberg e Albrektsson (54) recomendarem a realização de várias leituras, no mesmo implante, por os valores poderem variar de zona para zona. Foram realizados testes comparativos procurando diferenças, com significado estatístico, nos valores obtidos para as quatro zonas analisadas. Para isso efectuamos o teste de Friedmann, não tendo sido observadas diferenças, intra-implante, nos implantes TPS, pertencentes ao grupo 6, para $p < 0,05$ (para informação mais detalhada, consultar o anexo 5). Para os implantes do grupo 2 verificou-se a existência de diferenças com uma significância estatística para uma $p < 0,001$ (para informação mais detalhada, consultar o anexo 6).

Procurando saber, concretamente entre que zonas ocorreram essas diferenças, realizamos comparações uni-laterais, entre os resultados obtidos para as quatro zonas, tendo recorrido ao teste de Wilcoxon (para informação mais detalhada, consultar o anexo 7).

A tabela 4.4 mostra, em resumo, os resultados obtidos, para o grupo 2.

	Grupo 2		
Zona	Chanfro	Chanfro transversal	Fundo da espira
Chanfro transversal	$p < 0,1$		
Fundo da espira	$p < 0,05$	$p < 0,05$	
Ponta	$p > 0,1$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

Tabela 4.4 – Significância estatística para a comparação entre as quatro zonas analisadas, no grupo 2, com recurso ao teste Wilcoxon, uni-lateral (valores corrigidos em função do número de comparações efectuadas).

O teste Wilcoxon, uni-lateral, mostra existirem diferenças, com significado estatístico, para $p < 0,05$, entre os valores de rugosidade obtidos para o fundo de espira e o chanfro, o fundo de espira e o chanfro transversal, a ponta do implante e o chanfro transversal e a ponta do implante e o funda da espira. Também se observaram diferenças, mas para uma $p < 0,1$, para os valores de rugosidade obtidos no chanfro transversal e no chanfro. Não foram observadas diferenças nos valores obtidos nas medições na ponta do implante e no chanfro (para informação mais detalhada, consultar o anexo 7).

1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

1.2.1 Análise por espectrometria por fótons de raio-X (XPS)

Os resultados obtidos para a análise XPS tiveram por base, uma amostra de dezoito implantes, distribuídos equitativamente pelos seis grupos.

Os gráficos 4.9 a 4.20 representam exemplos de espectros de XPS obtidos para cada uma das seis superfícies testadas e os correspondentes espectros de XPS, de alta resolução, relativos aos picos Ti 2p (titânio), O 1s (oxigênio) e C 1s (carbono). A sua observação mostra-nos picos mais acentuados correspondentes aos elementos titânio, oxigênio e carbono.

A análise dos espectros de alta resolução (gráficos 4.10, 4.12, 4.14, 4.16, 4.18 e 4.20) mostra-nos que, para qualquer um dos grupos analisados, existem dois picos correspondentes ao Ti 2p e Ti 2s, com energias de ligação de aproximadamente 458 eV e 464 eV, um pico correspondente ao C 1s, com uma energia de ligação de aproximadamente 285 eV e um pico correspondente ao O 1s, com uma energia de ligação de aproximadamente 530 eV. As superfícies são maioritariamente formadas por óxido de titânio (TiO₂).

Capítulo IV – Resultados

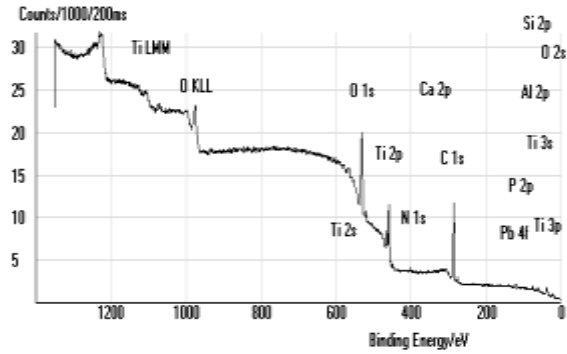


Gráfico 4.9 – Espectro XPS correspondente a um implante do grupo 1.

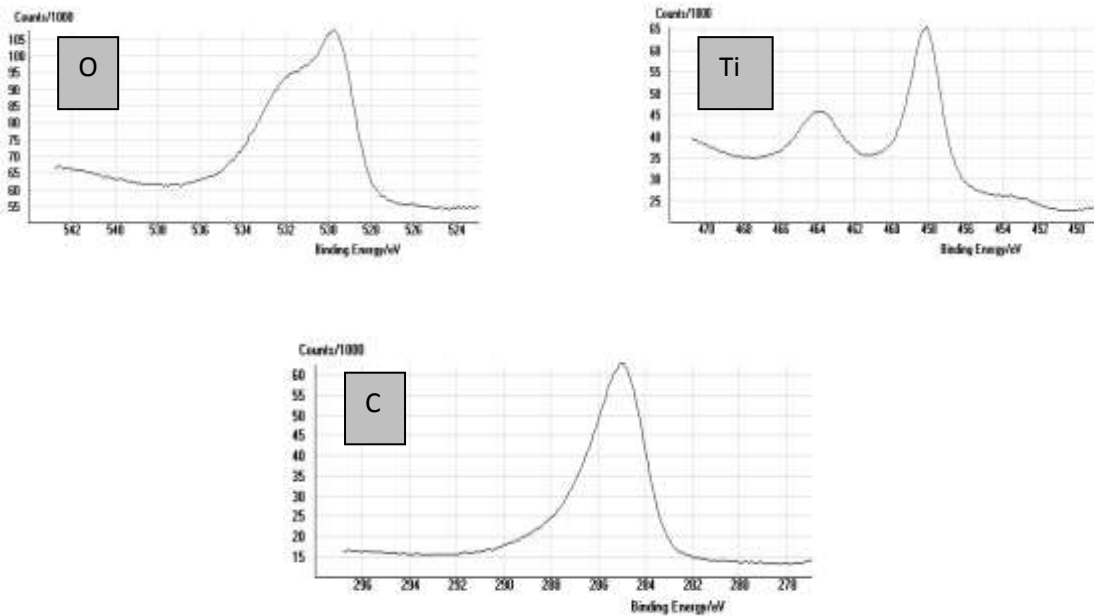


Gráfico 4.10 – Espectro XPS, de alta resolução, correspondente a um implante do grupo 1, mostrando os picos associados ao oxigênio, titânio e carbono.

Capítulo IV - Resultados

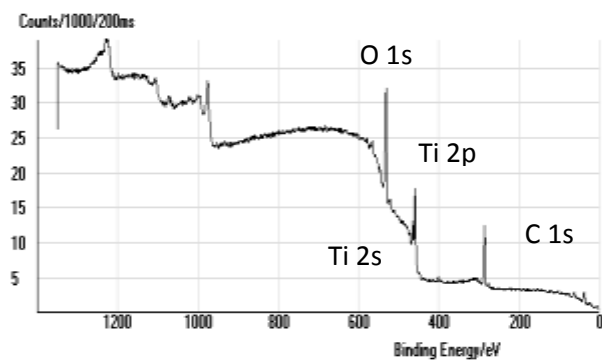


Gráfico 4.11 – Espectro XPS correspondente a um implante do grupo 2.

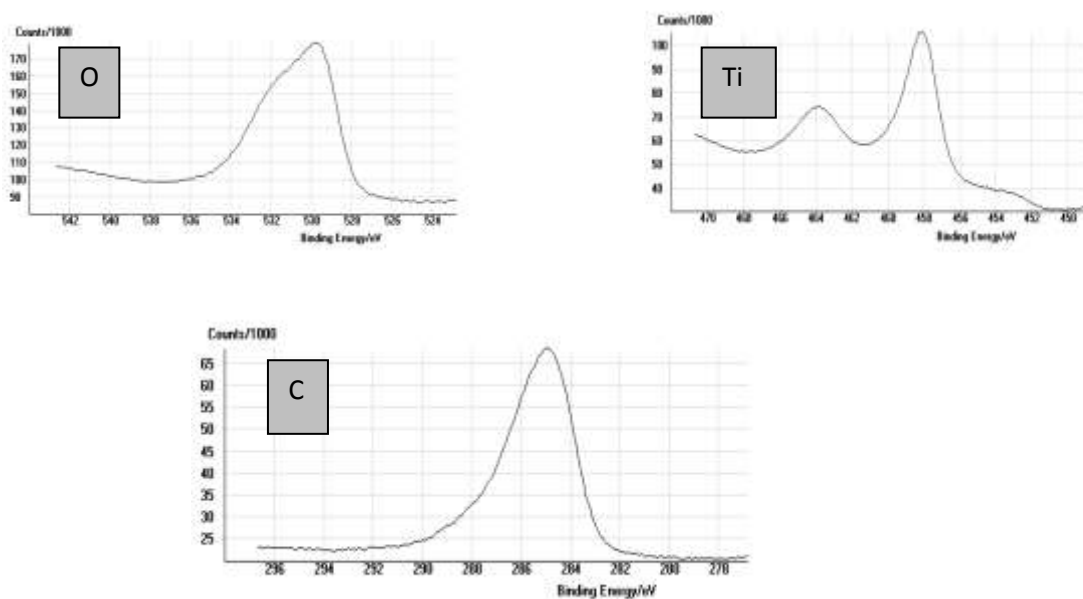


Gráfico 4.12 – Espectro XPS, de alta resolução, correspondente a um implante do grupo 2, mostrando os picos associados ao oxigénio, titânio e carbono.

Capítulo IV – Resultados

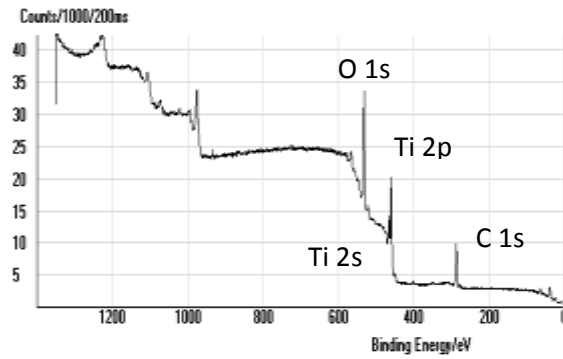


Gráfico 4.13 – Espectro XPS correspondente a um implante do grupo 3.

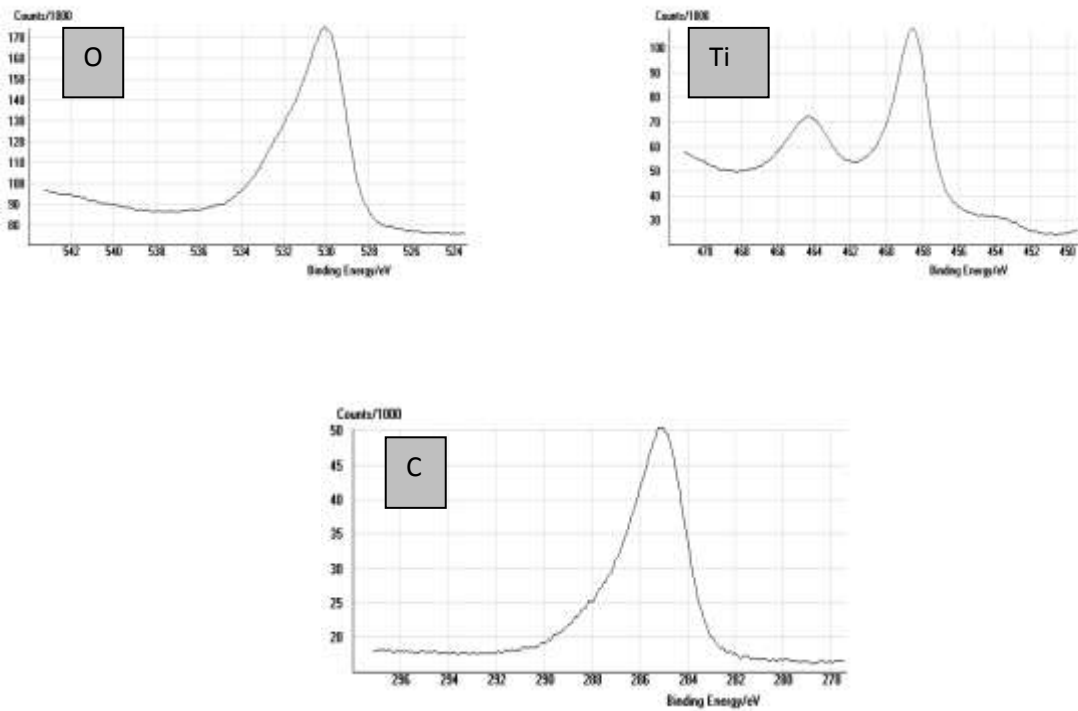


Gráfico 4.14 – Espectro XPS, de alta resolução, correspondente a um implante do grupo 3, mostrando os picos associados ao oxigênio, titânio e carbono.

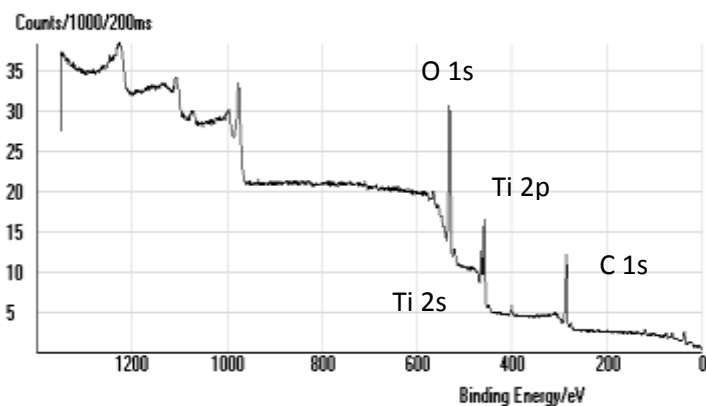


Gráfico 4.15 – Espectro XPS correspondente a um implante do grupo 4.

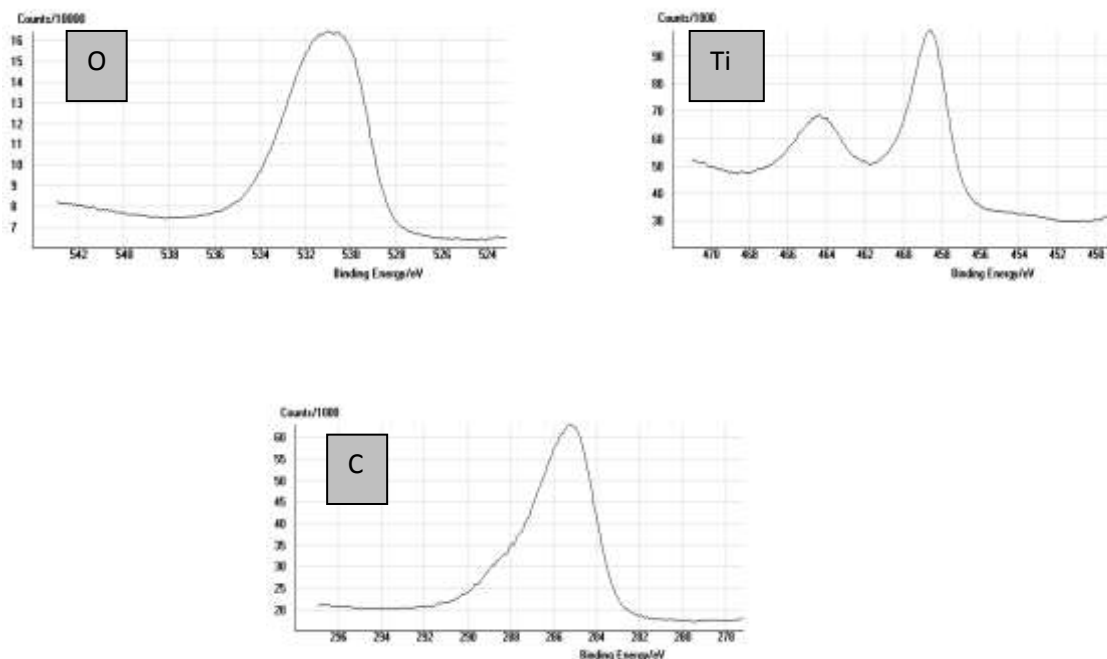


Gráfico 4.16 – Espectro de XPS, de alta resolução, correspondente a um implante do grupo 4, mostrando os picos associados ao oxigénio, titânio e carbono.

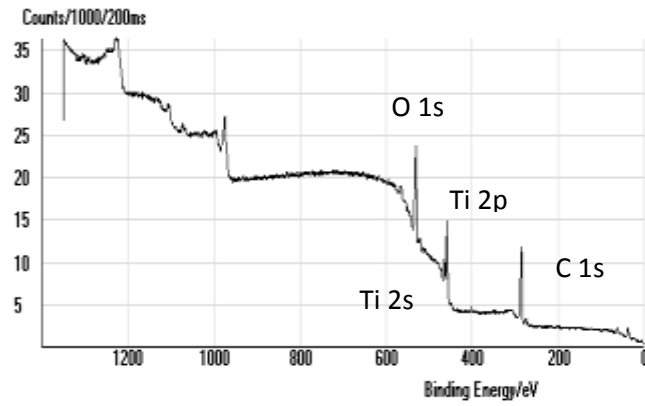


Gráfico 4.17 – Espectro XPS correspondente a um implante do grupo 5.

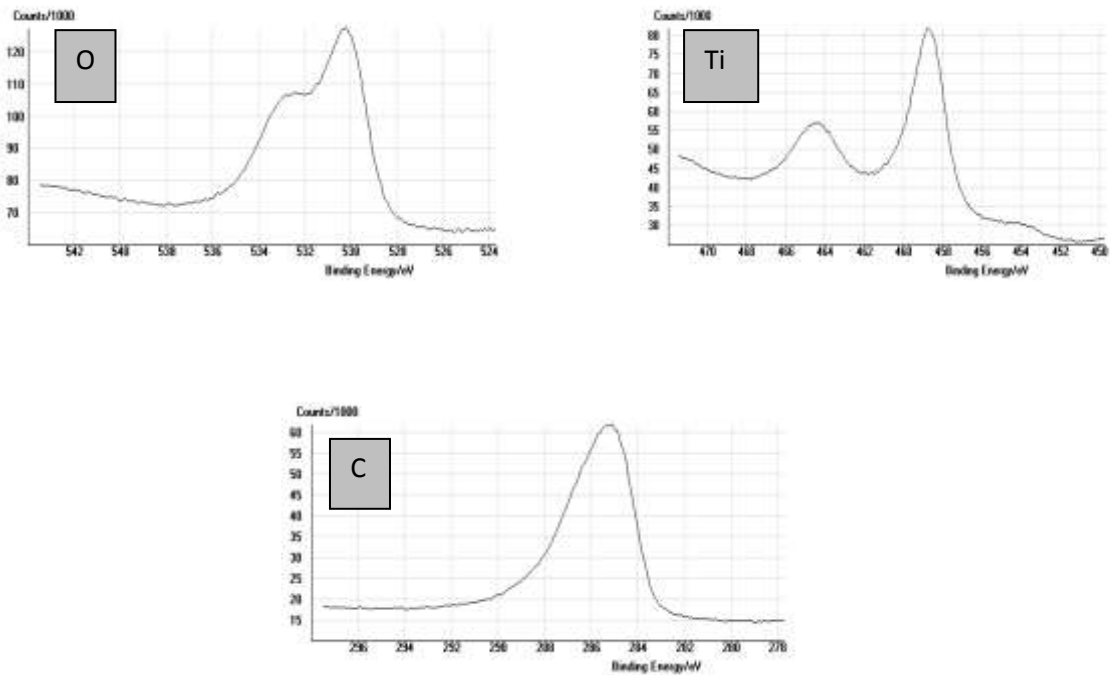


Gráfico 4.18 – Espectro de XPS, de alta resolução, correspondente a um implante do grupo 5, mostrando os picos associados ao oxigénio, titânio e carbono.

Capítulo IV - Resultados

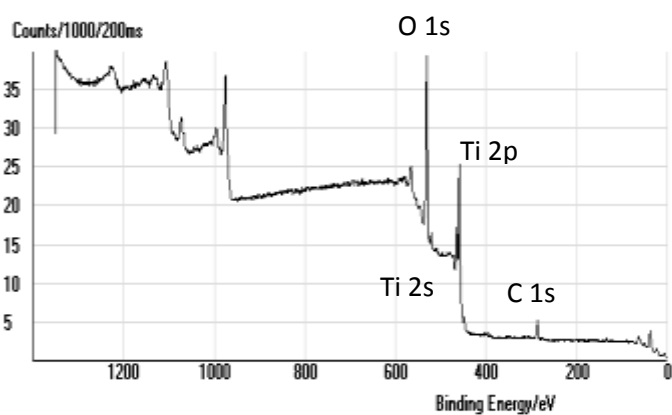


Gráfico 4.19 – Espectro XPS correspondente a um implante do grupo 6.

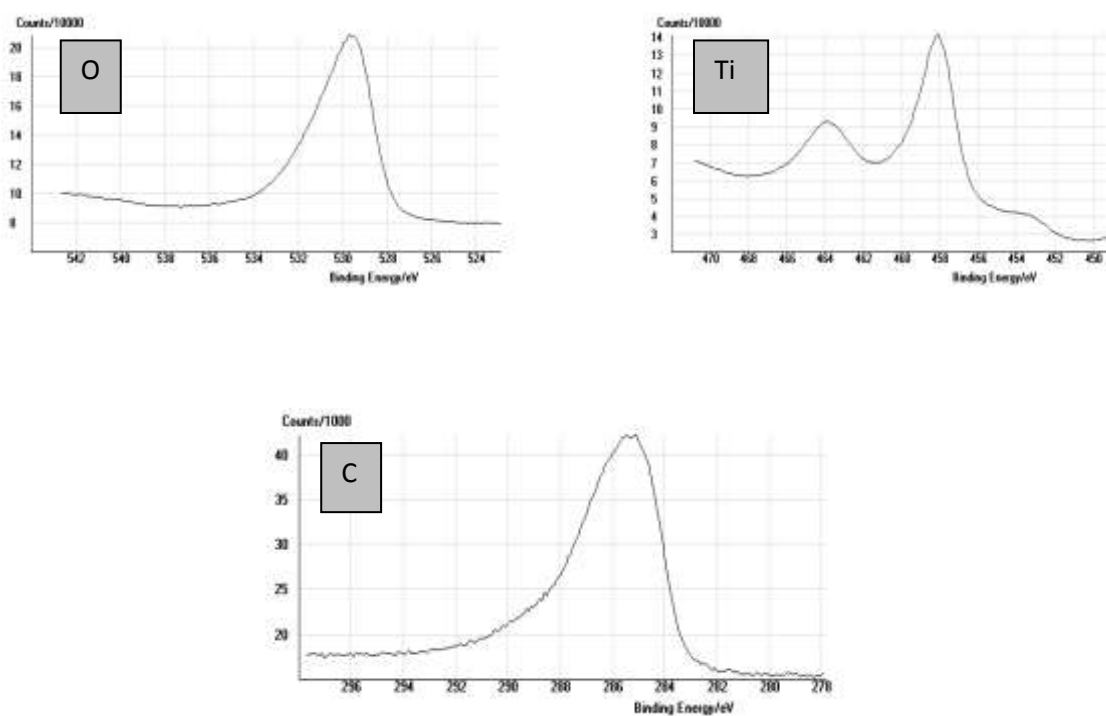


Gráfico 4.20 – Espectro XPS, de alta resolução, correspondente a um implante do grupo 6, mostrando os picos associados ao oxigénio, titânio e carbono.

A análise dos seis espectros mostra picos mais elevados de titânio e oxigénio e menores de carbono para os implantes do grupo 6.

Capítulo IV – Resultados

Para além destes três elementos químicos, foram observados outros, em muito menores concentrações, por vezes residuais, tais como o azoto, o flúor, o alumínio, o silício, o fósforo e o cálcio. Desses outros elementos é de destacar a presença de duas fases de chumbo, Pb 4f (4f5 + 4f7), nos implantes maquinados, dos grupos 1 e 2.

Os resultados obtidos da análise da composição química de três implantes pertencentes a cada um dos seis grupos, obtidos a partir da quantificação dos respectivos espectros de XPS, estão representados nas tabelas 4.5 a 4.10. Os valores estão expressos em % atómica (para informação mais detalhada, consultar o anexo 8). Cada implante é identificado por um número e pelo grupo a que pertence.

	Elementos	C 1s	N 1s	O 1s	F 1s	Al 2p	Si 2p	P 2p	Ca 2p	Ti 2p (2p1 + 2p3)	Pb 4f (4f5 + 4f7)
	Implantes										
Grupo 1	1	58,35	1,47	27,21	0,47	4,45	1,09	0,23	0,11	6,58	0,03
	2	50,17	1,56	32,19	0,68	4,82	0,98	0,19	0,17	9,17	0,07
	3	45,44	1,31	35,19	0,87	5,99	1,32	0,21	0,15	9,45	0,07

Tabela 4.5 – Composição química da superfície de três implantes do grupo 1 (% atómica).

	Elementos	C 1s	N 1s	O 1s	F 1s	Al 2p	Si 2p	P 2p	Ca 2p	Ti 2p (2p1 + 2p3)	Pb 4f (4f5 + 4f7)
	Implantes										
Grupo 2	1	45,30	2,80	35,97	0,40	2,85	2,00	0,66	0,35	9,60	0,08
	2	41,80	2,37	38,16	0,21	2,94	0,80	0,71	0,41	12,50	0,09
	3	43,90	2,57	36,76	0,42	2,19	1,39	0,66	0,32	11,70	0,09

Tabela 4.6 – Composição química da superfície de três implantes do grupo 2 (% atómica).

	Elementos	C 1s	N 1s	O 1s	F 1s	Al 2p	Si 2p	P 2p	Ca 2p	Ti 2p (2p1 + 2p3)	Pb 4f (4f5 + 4f7)
	Implantes										
Grupo 3	1	40,82	1,86	39,99	0,04	1,89	0,95	0,15	0,54	13,76	0,00
	2	42,56	2,68	37,66	0,45	1,85	1,41	0,20	0,61	12,60	0,00
	3	43,13	2,98	36,82	0,37	2,10	3,54	0,34	0,43	10,29	0,00

Tabela 4.7 – Composição química da superfície de três implantes do grupo 3 (% atómica).

Capítulo IV - Resultados

	Elementos	C 1s	N 1s	O 1s	F 1s	Al 2p	Si 2p	P 2p	Ca 2p	Ti 2p (2p1 + 2p3)	Pb 4f (4f5 + 4f7)
	Implantes										
Grupo 4	1	43,49	3,44	36,10	0,63	5,78	1,54	0,58	0,21	8,25	0,00
	2	42,78	2,86	37,75	0,47	5,26	1,26	0,44	0,16	9,02	0,00
	3	49,11	3,13	33,37	0,55	4,35	1,29	0,47	0,15	7,58	0,00

Tabela 4.8 – Composição química da superfície de três implantes do grupo 4 (% atômica).

	Elementos	C 1s	N 1s	O 1s	F 1s	Al 2p	Si 2p	P 2p	Ca 2p	Ti 2p (2p1 + 2p3)	Pb 4f (4f5 + 4f7)
	Implantes										
Grupo 5	1	58,47	2,03	28,15	0,20	1,37	0,91	0,20	0,44	8,23	0,00
	2	54,60	1,72	30,90	0,27	1,31	0,72	0,18	0,49	9,82	0,00
	3	68,91	1,61	21,32	0,15	0,37	0,61	0,17	0,74	6,12	0,00

Tabela 4.9 – Composição química da superfície de três implantes do grupo 5 (% atômica).

	Elementos	C 1s	N 1s	O 1s	F 1s	Al 2p	Si 2p	P 2p	Ca 2p	Ti 2p (2p1 + 2p3)	Pb 4f (4f5 + 4f7)
	Implantes										
Grupo 6	1	17,85	2,45	53,70	0,63	1,28	0,75	1,43	0,29	21,61	0,00
	2	33,61	1,98	43,53	0,59	0,91	0,97	1,05	0,31	17,05	0,00
	3	29,96	1,70	47,16	0,54	1,15	0,72	1,00	0,19	17,58	0,00

Tabela 4.10 – Composição química da superfície de três implantes do grupo 6 (% atômica).

Na Tabela 4.11, é possível observar a média, o desvio e o erro padrão da concentração dos elementos químicos analisados, obtidos para o total dos dezoito implantes analisados (para informação mais detalhada, consultar o anexo 9).

Capítulo IV – Resultados

ELEMENTOS	C 1s	N 1s	O 1s	F 1s	Al 2p	Si 2p	P 2p	Ca 2p	Ti 2p (2p1 + 2p3)	Pb 4f (4f5 + 4f7)
TOTAL										
MÉDIA	45,01	2,25	36,22	0,44	2,83	1,24	0,49	0,34	11,16	0,02
MÁXIMO	68,91	3,44	53,70	0,87	5,99	3,54	1,43	0,74	21,61	0,09
MÍNIMO	17,85	1,31	21,32	0,04	0,37	0,61	0,15	0,11	6,12	0,00
Amplitude	51,06	2,13	32,38	0,83	5,62	2,93	1,28	0,63	15,49	0,09
Desvio padrão	11,39	0,64	7,37	0,21	1,81	0,68	0,37	0,18	4,12	0,04
Erro padrão	2,69	0,15	1,74	0,05	0,43	0,16	0,09	0,04	0,97	0,01

Tabela 4.11 – Composição química obtida, considerando todos os dezoito implantes (% atômica).

Pela análise das tabelas verifica-se que os elementos que se apresentam com maiores concentrações, no universo total dos dezoito implantes analisados, são o carbono, com um valor médio de 45,01% e um desvio padrão de 11,39%, seguido do oxigénio com uma percentagem média de 36,22% e um desvio-padrão de 7,37% e o titânio, com um valor médio de 11,16% e um desvio-padrão de 4,12%. Os valores de carbono variaram entre um mínimo de 17,85%, obtido no implante 1 do grupo 6, e os 68,91%, encontrados no implante 3 do grupo 5. Os valores do oxigénio variaram entre um mínimo de 21,32%, obtido no implante 3 do grupo 5 e um valor máximo de 53,70% encontrado no implante 1 do grupo 6. Por sua vez, os valores do titânio variaram entre um mínimo de 6,12%, encontrado no implante 3 do grupo 5 e um valor máximo de 21,61%, presente no implante 1 do grupo 6. Foram encontradas duas fases do chumbo, apenas nos implantes maquinados, pertencentes aos grupos 1 e 2, com uma percentagem média de 0,02% e um desvio-padrão de 0,04%, tendo sido o valor máximo de 0,09% encontrado nos implantes 2 e 3 do grupo 2. Os restantes elementos foram encontrados em percentagens baixas, com valores médios inferiores a 3%. O valor médio do azoto foi de 2,25% com um desvio-padrão de 0,64%, tendo variado entre um máximo de 3,44%, encontrado no implante 1 do grupo 4 e um mínimo de 1,31%, observado no implante 3 do grupo 1. O valor médio obtido para o elemento flúor foi de 0,44%, com um desvio-padrão de 0,21%, tendo variado entre um mínimo de aproximadamente 0,04%, observado no implante 1 do grupo 3 e um máximo de 0,87% encontrado no implante 3 do grupo 1. O elemento alumínio apresentou um valor médio de 2,83%, com um desvio-padrão de 1,81%, tendo variado entre um valor mínimo de 0,37% verificado no implante 3 do grupo 5 e um valor máximo de 5,99% observado no implante 3 do grupo 1. O valor médio de silício foi de 1,24% com um desvio-padrão de 0,68%, tendo sido observado o valor mínimo de 0,61% no implante 3 do grupo 5 e um valor máximo de 3,54% verificado no implante 3 do grupo 3. O valor médio de fósforo foi de 0,49%, com um desvio-padrão de 0,37%, variando entre um valor máximo de 1,43% observado no implante 1 do grupo 6 e um valor mínimo de 0,15% encontrado no implante 1 do grupo 3. Para o cálcio foi

Capítulo IV - Resultados

encontrado um valor médio de 0,34% com um desvio-padrão de 0,18%, tendo variado entre um valor mínimo de 0,11% obtido no implante 1 do grupo 1 e um valor máximo de 0,74% encontrado no implante 3 do grupo 5 (para informação mais detalhada, consultar os anexos 8 e 9).

A Tabela 4.12 mostra os valores médios, a amplitude e o desvio padrão das concentrações, encontrados para cada um dos seis grupos de implantes analisados. Estes resultados foram obtidos tendo por base os valores correspondentes a cada um dos três implantes analisados, por grupo (para informação mais detalhada, consultar o anexo 8).

ELEMENTOS GRUPOS										
	C 1s	N 1s	O 1s	F 1s	Al 2p	Si 2p	P 2p	Ca 2p	Ti 2p (2p1 + 2p3)	Pb 4f (4f5 + 4f7)
1										
MÉDIA	51,32	1,45	31,53	0,67	5,09	1,13	0,21	0,14	8,40	0,06
Amplitude	12,91	0,25	7,98	0,40	1,54	0,34	0,04	0,06	2,87	0,04
Desvio padrão	6,53	0,13	4,03	0,02	0,80	0,17	0,02	0,03	1,58	0,02
2										
MÉDIA	43,67	2,58	36,96	0,34	2,66	1,40	0,68	0,36	11,27	0,09
Amplitude	3,50	0,43	2,19	0,21	0,75	1,20	0,05	0,09	2,90	0,01
Desvio padrão	1,76	0,22	1,11	0,12	0,41	0,6	0,03	0,05	1,50	0,01
3										
MÉDIA	42,17	2,51	38,16	0,29	1,95	1,97	0,23	0,53	12,22	0,00
Amplitude	2,31	1,12	3,17	0,41	0,25	2,59	0,19	0,18	3,47	0,00
Desvio padrão	1,20	0,58	1,64	0,22	0,13	1,38	0,10	0,09	1,77	0,00
4										
MÉDIA	45,13	3,14	35,74	0,55	5,13	1,36	0,50	0,17	8,28	0,00
Amplitude	6,33	0,58	4,38	0,16	1,43	0,28	0,14	0,06	1,44	0,00
Desvio padrão	3,47	0,29	2,21	0,08	0,72	0,15	0,07	0,03	0,72	0,00
5										
MÉDIA	60,66	1,79	26,79	0,21	1,02	0,75	0,18	0,56	8,06	0,00
Amplitude	14,31	0,42	9,58	0,12	1,00	0,30	0,03	0,30	3,70	0,00
Desvio padrão	7,40	0,22	4,93	0,06	0,56	0,15	0,02	0,16	1,86	0,00
6										
MÉDIA	27,14	2,04	48,13	0,59	1,11	0,81	1,16	0,26	18,75	0,00
Amplitude	15,76	0,75	10,17	0,09	0,37	0,25	0,43	0,12	4,56	0,00
Desvio padrão	8,25	0,38	5,15	0,05	0,19	0,14	0,24	0,06	2,49	0,00

Tabela 4.12 – Composição química, por grupo, considerando as três amostras de cada grupo (% atômica).

Os valores mais elevados de carbono foram obtidos para os implantes do grupo 5, com um valor médio de 60,66% e uma amplitude de variação de resultados de 14,31%. Os mais baixos foram obtidos pelo grupo 6, com valores médios de 27,14% e uma amplitude de variação de 15,76%, semelhante à do grupo 5. Nos restantes grupos, os valores obtidos foram de 51,32%, valor médio encontrado no grupo 1 e uma amplitude de variação de 12,91%. No grupo 2 foi encontrado um valor médio de 43,67%, com uma amplitude de variação de 3,50%. O valor médio no grupo 3 foi de 42,17%, e uma amplitude de variação de 2,31%. No grupo 4 a média obtida foi de 45,13% e uma amplitude de variação de 6,33%. Foram observadas amplitudes de variação elevadas para o elemento carbono, para os grupos 1, 5 e 6, com valores acima dos 10%.

Para o elemento oxigénio, os valores médios mais elevados foram obtidos pelo grupo 6, com 48,13% e uma amplitude de variação de 10,17%, sendo os valores mais baixos encontrados no grupo 5, com um valor médio de 26,79% e uma amplitude de variação de 9,58%. No grupo 1, o valor médio encontrado, foi de 31,53%, com uma amplitude de variação de 7,98%. No grupo 2, encontrou-se um valor médio de 36,96% e uma amplitude de variação de resultados, de 2,19%. No grupo 3, o valor médio foi de 38,16% e uma amplitude de variação de 3,17%. A concentração média no grupo 4 foi de 35,74% com uma amplitude de variação de 4,38%.

Quanto ao titânio, os valores mais elevados foram observados no grupo 6, com um valor médio de 18,75% e uma amplitude de variação de 4,56%, tendo os valores mais baixos sido obtidos pelo grupo 5, com valores médios de 8,06% e uma amplitude de variação de 3,70%. No grupo 1 o valor médio obtido foi de 8,40% e uma amplitude de variação de 2,87%. No grupo 2 o valor médio encontrado foi de 11,27% e uma amplitude de variação de 2,90%. No grupo 3 a concentração média obtida foi de 12,22% e uma amplitude de variação de 3,47%. No grupo 4 o valor médio obtido foi de 8,28% e uma amplitude de 1,44%.

Os valores médios, mais elevados, de alumínio foram encontrados para os grupos 1 e 4, com 5,09 e 5,13%, respectivamente, e amplitudes de variação respectivamente, de 1,54% e 1,43%.

Os valores médios, mais elevados, de azoto foram encontrados no grupo 4, com um valor de 3,14% e uma amplitude de variação de 0,58%. Os mais baixos foram obtidos pelo grupo 1, com 1,45% e uma amplitude de variação de 0,25%.

O grupo 5 apresentou o valor médio mais baixo de flúor com um valor de 0,21% e uma amplitude de variação de 0,12%, tendo o valor mais elevado sido encontrado no grupo 1, com um valor médio de 0,67% e uma amplitude de variação de 0,40%.

O valor médio, mais elevado, do silício foi de 1,97% e uma amplitude de variação de 2,59%, tendo sido encontrada no grupo 3. O valor médio mais baixo foi de 0,75% e uma amplitude de variação de 0,30%. Este valor foi encontrado no grupo 5.

Os valores médios do fósforo variaram entre o máximo de 1,16% e uma amplitude de variação de 0,43%, observado no grupo 6 e um valor mínimo de 0,18% e uma amplitude de variação de 0,03%, encontrada no grupo 5.

O valor médio do cálcio variou entre os 0,14% e uma amplitude de 0,06% obtida no grupo 1 e os 0,56% e uma amplitude de variação de 0,30% encontrada no grupo 5.

Da observação dos resultados médios, por grupo, verificamos que a concentração média de titânio variou entre os 8,06% e os 18,75%, a de carbono entre os 27,14% e os 60,66% e a de oxigénio entre os 26,79% e os 48,13%. As percentagens médias, mais elevadas, de titânio e oxigénio foram observadas para o grupo 6, formado por implantes TPS. As maiores percentagens de carbono foram obtidas pelo grupo 5.

A Tabela 4.13 mostra os valores da média, da amplitude de variação e do desvio-padrão obtidos para os três grandes tipos de superfície analisados, isto é, implantes maquinados, submetidos a jactamento e ataque ácido e, finalmente, revestidos com *spray* de plasma de titânio formando, respectivamente, as classes 1, 2 e 3 (anexo 10). Conforme foi referido no Capítulo III, dos materiais e métodos, os implantes dos grupos 1 e 2 foram agrupados na classe 1, os dos grupos 3, 4 e 5, foram reunidos na classe 2 e, finalmente, os do grupo 6 formaram a classe 3. Este agrupamento obedeceu a critérios referentes ao tipo de tratamento de superfície aplicado a cada um deles.

ELEMENTOS CLASSES		C 1s	N 1s	O 1s	F 1s	Al 2p	Si 2p	P 2p	Ca 2p	Ti 2p (2p1 + 2p3)	Pb 4f (4f5 + 4f7)
		MAQUINADOS 1	MÉDIA	47,49	2,01	34,25	0,51	3,87	1,26	0,44	0,25
Amplitude	16,55		1,49	10,95	0,66	3,80	1,20	0,52	0,30	5,92	0,06
Desvio padrão	5,99		0,64	3,98	0,23	1,45	0,42	0,26	0,12	2,09	0,02
JACTEADOS 2	MÉDIA	49,32	2,48	33,56	0,35	2,70	1,36	0,30	0,42	9,52	0,00
	Amplitude	28,09	1,83	18,67	0,59	5,41	2,93	0,43	0,59	7,64	0,00
	Desvio padrão	9,54	0,68	5,90	0,20	1,92	0,88	0,16	0,21	0,24	0,00
TPS 3	MÉDIA	27,14	2,04	48,13	0,59	1,11	0,81	1,16	0,26	18,75	0,00
	Amplitude	15,76	0,75	10,17	0,09	0,37	0,25	0,43	0,12	4,56	0,00
	Desvio padrão	8,25	0,38	5,15	0,05	0,19	0,14	0,24	0,06	2,49	0,00

Tabela 4.13 – Composição química, por tipo de superfície, considerando as três classes de superfície analisadas (% atómica).

Da observação da tabela 4.13, onde são representados os valores obtidos, por elemento, para as classes de superfícies analisadas, verifica-se que o valor médio do carbono variou entre um máximo de 49,32%, observado na classe 2, e um mínimo de 27,14%, encontrado na classe 3. A concentração média de carbono, na classe 1, foi de 47,49%, valor semelhante ao encontrado na classe 2. Os valores foram semelhantes nas classes 1 e 2 e, significativamente menores para a classe 3. As amplitudes de variação dos valores são aproximadas para as classes 1 e 3, com valores de 16,55% e 15,76%, respectivamente, tendo sido bastante maiores, com um valor de 28,09%, na classe 2.

Para o elemento azoto, as concentrações média observadas nas três classes de implantes foram semelhantes, com valores da ordem dos 2%, para as classes 1 e 3, sendo ligeiramente superior para os implantes da classe 2, com um valor médio de 2,48%. As amplitudes de variação dos valores oscilaram entre os 0,75% observados na classe 3 e os 1,83% da classe 2. A amplitude de variação observada na classe 1 foi de 1,49%.

Os valores médios de oxigénio foram semelhantes para as classes 1 e 2, com 34,25% e 33,56%, respectivamente, e bastante superiores para a classe 3, com um valor médio de 48,13%. As amplitudes de variação foram semelhantes para as classes 1 e 3, com valores próximo dos 10%, concretamente, 10,95% e 10,17%, e bastante superior, com um valor de 18,67%, para a classe 2.

Para o elemento flúor, as concentrações média observadas foram muito baixas, tendo sido de 0,51% e uma amplitude de variação de 0,66%, para a classe 1; 0,35% e uma amplitude de 0,59%, para a classe 2 e 0,59% e uma amplitude de variação de 0,09% para a classe 3. As concentrações médias observadas foram semelhantes para as classes 1 e 3 e ligeiramente inferiores para a classe 2. As amplitudes de variação observadas para este elemento, foram praticamente sobreponíveis para as classes 1 e 2 tendo a classe 3 apresentado uma amplitude de variação das concentrações médias, muito baixa.

As concentrações médias do alumínio foram maiores para a classe 1, com um valor de 3,87% e uma amplitude de variação de 3,80%, tendo sido mais baixas para a classe 3, com um valor médio de 1,11% e uma amplitude de variação também menor, de 0,37%. A concentração média deste elemento para a classe 2 foi de 2,70% com uma amplitude de variação, mais elevada, de 5,41%. As amplitudes de variação foram elevadas para as classes 1 e 2 tendo sido significativamente menores para a classe 3.

As concentrações médias obtidas para o silício foram semelhantes para as classes 1 e 2 com valores de 1,26% e 1,36%, respectivamente, e um valor menor, de 0,81%, para a classe 3. A amplitude de variação dos resultados foi baixa para a classe 3, com um valor de 0,25%, de 1,20% para a classe 1 e um valor bastante mais elevado, de 2,93%, para a classe 2. Relativamente a este elemento é importante referir que o implante 3 do grupo 3

apresentou um valor médio muito mais elevado do que os restantes dois implantes pertencentes ao mesmo grupo, o que, afecta, em grande medida, o valor alcançado pela classe 2, classe a que pertence este implante (ver tabela 4.7).

Os valores da concentração média para o elemento fósforo variaram entre os 0,30% encontrados na classe 2 e os 1,16% obtidos pela classe 3. A concentração média deste elemento observada na classe 1 foi de 0,44%. Os valores encontrados para este elemento foram muito semelhantes nas três classes analisadas. As amplitudes de variação foram igualmente semelhantes e baixas para as três classes, tendo sido de 0,52% para a classe 1 e 0,43% para as classes 2 e 3.

Os valores médios encontrados para o cálcio foram semelhantes para as três classes, com valores de 0,25%, 0,42% e 0,26% para as classes 1, 2 e 3, respectivamente. As amplitudes de variação dos resultados obtidos para cada classe foram baixas, sendo de 0,30%, 0,59% e 0,12%, respectivamente para as classes 1, 2 e 3.

As concentrações médias obtidas para o titânio foram semelhantes para as classes 1 e 2, com valores médios de 9,83% e 9,52%, respectivamente e valores significativamente superiores, de 18,75%, para a classe 3. As amplitudes de variação dos resultados obtidos foram de 5,92%, para a classe 1; de 7,64%, para a classe 2 e 4,56%, para a classe 3. Os implantes da classe 2 foram aqueles que apresentaram as maiores amplitudes de variação.

Relativamente ao elemento chumbo, este só foi encontrado nos implantes maquinados pelo que, as classes 2 e 3 apresentam 0% de concentração. A concentração média encontrada para a classe 1 foi de 0,07% com uma amplitude de variação de aproximadamente 0,06%.

A tabela 4.14 mostra-nos as estimativas de concentração, a 95% de confiança, para cada uma das classes de implantes, com base nas análises realizadas (para informação mais detalhada, consultar o anexo 10).

O valor estimado para a concentração média do carbono, num intervalo com 95% de confiança, varia entre os 41,21% e os 53,78% para a classe 1; entre os 41,98% e os 56,65% para a classe 2 e os 6,60% e os 47,63% para a classe 3. Os valores médios esperados são semelhantes para as classes 1 e 2, sendo previsível um valor médio menor para a classe 3, embora com uma grande amplitude do intervalo de confiança, devido ao reduzido tamanho da amostra analisada.

Para o azoto, e com um intervalo de confiança a 95%, os valores médios estimados variam entre os 1,34% e os 2,69% para a classe 1; entre os 1,96% e os 3,00% para a classe 2 e os 1,10% e os 2,98% para a classe 3. Os valores médios estimados são bastante

semelhantes para as três classes de implantes embora no caso da classe 3 seja baseada num tamanho de amostra menor.

	ELEMENTOS		C 1s	N 1s	O 1s	F 1s	Al 2p	Si 2p	P 2p	Ca 2p	Ti 2p (2p1 + 2p3)	Pb 4f (4f5 + 4f7)
	CLASSES											
Estimativa de concentração a 95% de confiança	MAQUINADOS 1											
	Limite superior		53,78	2,69	38,42	0,75	5,39	1,71	0,71	0,38	12,03	0,10
	Média		47,49	2,01	34,25	0,51	3,87	1,26	0,44	0,25	9,83	0,07
	Limite inferior		41,21	1,34	30,07	0,26	2,36	0,82	0,17	0,12	7,64	0,05
	JACTEADOS 2											
	Limite superior		56,65	3,00	38,10	0,49	4,18	2,03	0,42	0,58	11,38	0,00
	Média		49,32	2,48	33,56	0,35	2,70	1,36	0,30	0,42	9,52	0,00
	Limite inferior		41,98	1,96	29,02	0,19	1,22	0,69	0,18	0,42	7,66	0,00
	TPS 3											
	Limite superior		47,63	2,98	60,93	0,70	1,58	1,15	1,74	0,42	24,94	0,00
	Média		27,14	2,04	48,13	0,59	1,11	0,81	1,16	0,26	18,75	0,00
	Limite inferior		6,60	1,10	35,33	0,47	0,65	0,47	0,57	0,10	12,55	0,00

Tabela 4.14 – Estimativa de concentração (% atómica), para os diferentes elementos, para um intervalo de confiança a 95%.

A estimativa de concentração média do oxigénio, para um intervalo de confiança a 95%, varia entre os 30,07% e os 38,42%, para a classe 1, entre os 29,02% e os 38,10%, para a classe 2 e entre os 35,33% e os 60,93%, para a classe 3. Os valores médios de oxigénio estimados, para este intervalo de confiança, são semelhantes para as classes 1 e 2, sendo maiores, com uma grande amplitude de variação para os implantes pertencentes à classe 3, devido, mais uma vez, ao tamanho reduzido da amostra de implantes analisados para esta classe.

Para o elemento flúor, e para um intervalo de confiança a 95%, os valores médios estimados variam entre os 0,26% e os 0,75%, para a classe 1; entre os 0,19% e os 0,49%, para a classe 2 e os 0,47 e os 0,70%, para a classe 3. Os valores médios estimados são ligeiramente superiores para as classes 1 e 3, comparativamente com a classe 2, apresentando a classe 1 uma amplitude de variação ligeiramente superior aos demais, para um intervalo de confiança a 95%.

A estimativa da concentração média, para um intervalo de confiança a 95%, para o alumínio varia entre os 2,36% e os 5,39%, para a classe 1; entre os 1,22% e os 4,18%, para a classe 2 e entre os 0,65% e os 1,58%, para a classe 3. Estimam-se assim, valores médios significativamente mais baixos, de alumínio, para a classe 3 do que para a 1. As amplitudes do intervalo de confiança são semelhantes para as classes 1 e 2 e significativamente menores para a classe 3.

As concentrações médias de silício, estimadas para um intervalo de confiança a 95%, variam entre os 0,82% e os 1,71%, para a classe 1; entre os 0,69% e os 2,03%, para a classe 2 e entre os 0,47% e os 1,15%, para a classe 3. A amplitude, dos intervalos de confiança a 95%, é maior para as classes 1 e 2, sendo também de esperar encontrar valores médios mais altos, deste elemento, para estas duas classes.

A estimativa das concentrações médias, para um intervalo de confiança a 95%, para o elemento fósforo varia entre os 0,17% e os 0,71% para a classe 1; entre os 0,18% e os 0,42%, para a classe 2 e entre os 0,57% e os 1,74%, para a classe 3. Trata-se assim de um elemento que se estima em concentrações médias muito baixas mas com um valor esperado mais elevado para os implantes da classe 3.

A estimativa das concentrações médias, para o elemento cálcio, com base nos resultados obtidos, e para um intervalo de confiança a 95%, variam entre os 0,12% e os 0,38%, para a classe 1; entre os 0,42% e os 0,58%, para a classe 2 e entre os 0,10% e os 0,42%, para a classe 3. São estimados valores baixos e sobreponíveis entre as classes 1 e 3, com amplitudes de variação pequenas e semelhantes.

As concentrações médias estimadas de titânio, para um intervalo de confiança a 95%, variam entre os 7,64% e os 12,03%, para a classe 1; entre os 7,66% e os 11,38%, para a classe 2 e entre os 12,55% e os 24,94%, para a classe 3. É assim estimada, com este grau de confiança, maior percentagem média de titânio para os implantes da classe 3 e valores semelhantes para as classes 1 e 2. A amplitude de variação, do intervalo de confiança a 95%, é semelhante para as classes 1 e 2, sendo bastante maior para a classe 3.

Com base nos resultados obtidos, não é de esperar encontrar chumbo nos implantes das classes 2 e 3. Na classe 1 é de esperar encontrar uma concentração média de chumbo variando entre os 0,05% e os 0,10%, para um intervalo de confiança a 95%.

Com vista a comparar as três classes de implantes, procurando verificar se existem diferenças, entre elas, no que diz respeito à concentração dos elementos carbono, oxigénio, fósforo, titânio e chumbo, foram realizadas provas não paramétricas, uma vez

que a nossa amostra era pequena. Foi realizado o teste Kruskal-Wallis tendo sido observadas diferenças entre as classes, para uma $p < 0,1$, para os elementos carbono, oxigénio e titânio; para uma $p < 0,025$ para o elemento fósforo e uma $p < 0,01$ para o elemento chumbo.

A tabela 4.15 mostra, em resumo, os resultados comparativos obtidos para as três classes analisadas (para informação mais detalhada, consultar o anexo 11).

Elementos	C 1s	O 1s	P 2p	Ti 2p (2p1 + 2p3)	Pb 4f (4f5 + 4f7)
P	$p < 0,1$	$p < 0,1$	$p < 0,025$	$p < 0,1$	$p < 0,01$

Tabela 4.15 – Significância estatística para a comparação entre as três classes, relativa aos elementos C 1s, O 1s, P 2p, Ti 2p (2p1 + 2p3) e Pb 4f (4f5 + 4f7) (valores corrigidos em função do número de comparações efectuadas).

Com base na verificação de que existiam diferenças, com significado estatístico, entre as três classes, relativamente aos elementos carbono, oxigénio, fósforo, titânio e chumbo, e com o objectivo de saber entre que classes, concretamente, existiam essas diferenças, realizamos comparações de uma só cauda, com recurso ao teste U-Mann Whitney. O resumo dos resultados está representado na tabela 4.16 (para informação mais detalhada, consultar o anexo 12).

Elemento	Carbono C 1s		Oxigénio O 1s		Fósforo P 2p		Titânio Ti 2p (2p1 + 2p3)		Chumbo Pb 4f (4f5 + 4f7)	
	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3
1	$p=1$	$p < 0,05$	$p=1$	$p < 0,05$	$p=1$	$p < 0,05$	$p > 0,1$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,05$
2		$p < 0,05$		$p < 0,05$		$p < 0,05$		$p < 0,05$		$p=1$

Tabela 4.16 – Significância estatística para a comparação entre classes, com recurso ao teste U-Mann Whitney, uni-lateral, relativas aos elementos C 1s, O 1s, P 2p, Ti 2p (2p1 + 2p3) e Pb 4f (4f5 + 4f7) (valores corrigidos em função do número de comparações efectuadas).

Da análise dos resultados do teste U-Mann Whitney verifica-se que não foram encontradas diferenças com significado estatístico ($p > 0,1$) para os elementos carbono, oxigénio, fósforo e titânio, entre as classes 1 e 2. Foram observadas concentrações

médias maiores na classe 1, comparativamente com a 2, com significado estatístico ($p < 0,01$), para o elemento chumbo (para informação mais detalhada, consultar o anexo 12).

Entre os implantes maquinados, pertencentes à classe 1, e os implantes TPS, pertencentes à classe 3, foram observadas diferenças estatisticamente significativas para todos os elementos analisados, tendo sido observada maior concentração média de carbono e chumbo na classe 1 e maior concentração média de oxigénio, fósforo e titânio, na classe 3 ($p < 0,05$) (para informação mais detalhada, consultar o anexo 12).

Também foram observadas diferenças com significado estatístico, para todos os elementos, com excepção do chumbo ($p = 1$), entre as classes 2 e 3, tendo sido encontrados valores médios mais altos de carbono, nos implantes da classe 2 e valores médios mais elevados de fósforo, oxigénio e titânio, nos implantes da classe 3 ($p < 0,05$) (para informação mais detalhada, consultar o anexo 12).

1.2.2 Análise por espectrometria de raio-X por energia dispersante (EDS)

A análise EDS surge como complemento à técnica XPS e permite a análise da composição química, a profundidades um pouco maiores do que as alcançadas com a análise XPS. Apesar de não ser analisado o núcleo dos implantes, consegue-se, com esta técnica, analisar a composição química dos implantes, abaixo da camada de óxidos.

O espectro da composição química dos implantes pertencentes aos seis grupos analisados, obtida por microanálise de raios X (EDS), pode ser observado nos gráficos 4.21 a 4.26. Este método de análise apresenta grandes limitações relativamente a elementos presentes em baixas quantidades.

Da observação dos respectivos espectros podemos verificar que todos os seis grupos de implantes apresentaram uma composição química semelhante com predomínio do elemento titânio. Para além deste elemento observaram-se outros elementos, tais como o alumínio, o silício e o carbono, com picos muito pequenos, por vezes residuais. A presença de um pico mais elevado, correspondente ao elemento alumínio, no implante do grupo 4, reflecte, provavelmente, o jactamento da superfície com partículas de óxido de alumínio que penetram sempre alguns micra de profundidade.

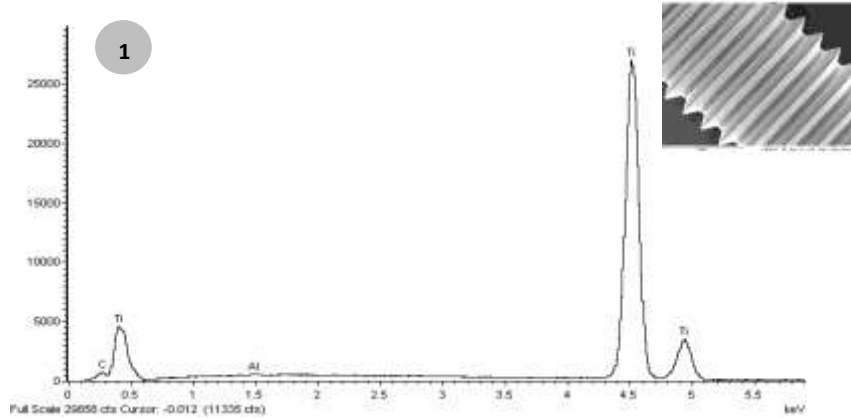


Gráfico 4.21 – Espectro da composição química de um implante do grupo 1 (Microanálise por raios X, EDS).

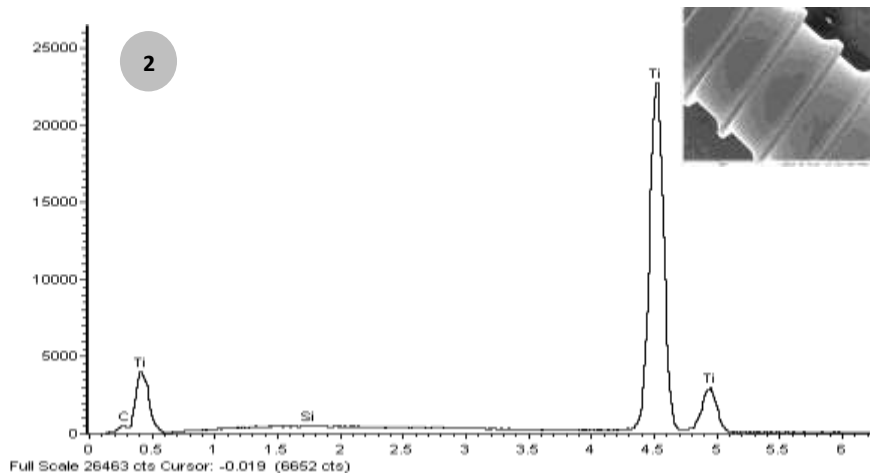


Gráfico 4.22 – Espectro da composição química de um implante do grupo 2 (Microanálise por raios X, EDS).

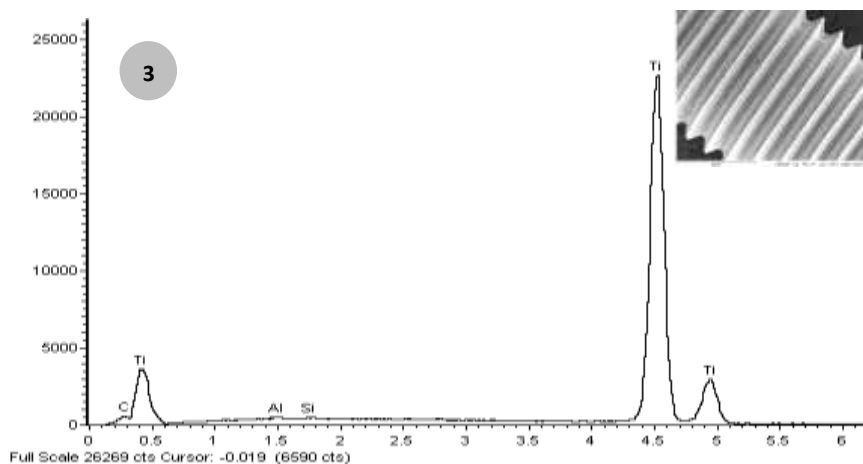


Gráfico 4.23 – Espectro da composição química de um implante do grupo 3 (Microanálise por raios X, EDS)

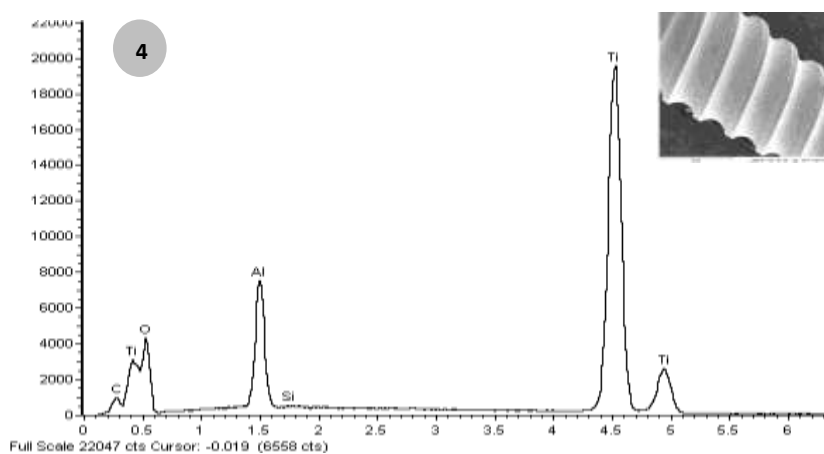


Gráfico 4.24 – Espectro da composição química de um implante do grupo 4 (Microanálise por raios X, EDS).

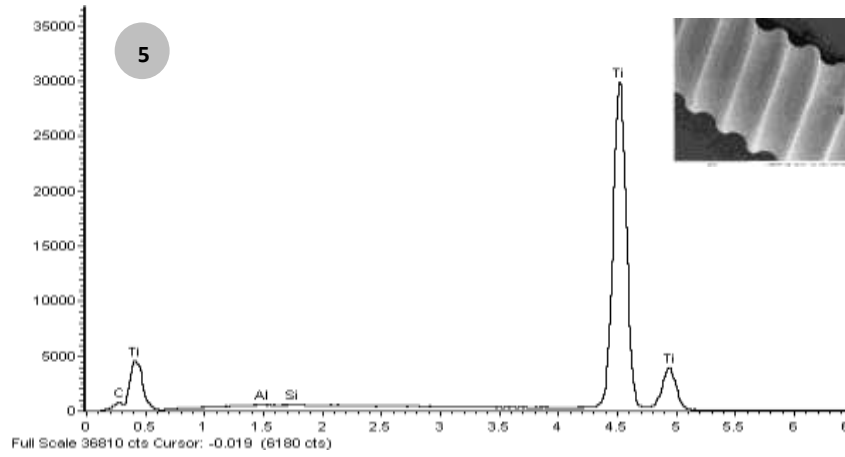


Gráfico 4.25 – Espectro da composição química de um implante do grupo 5 (Microanálise por raios X, EDS).

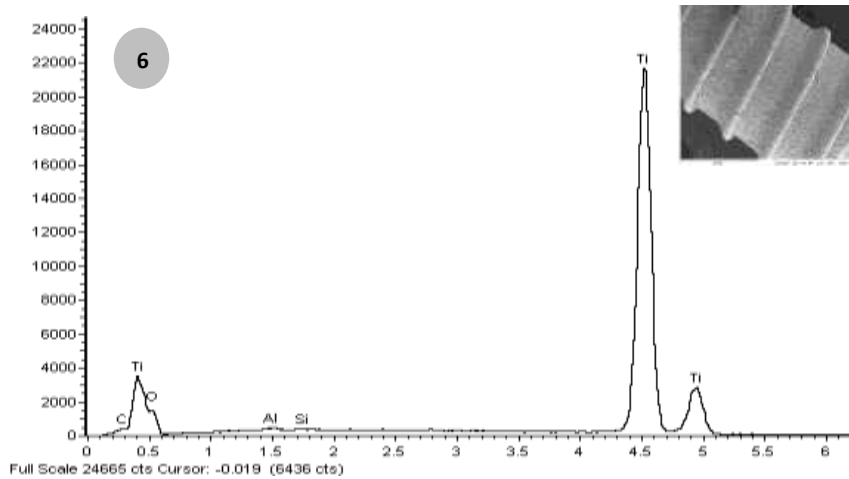


Gráfico 4.26 – Espectro da composição química de um implante do grupo 6 (Microanálise por raios X, EDS).

2. COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DOS IMPLANTES

Os implantes dos seis grupos foram semeados com células de medula óssea humana e cultivados por um período de 33 dias, em condições experimentais apropriadas para a proliferação e diferenciação osteoblástica, nomeadamente na presença de ácido ascórbico, beta-glicerofosfato e dexametasona. Durante o tempo de cultura os implantes colonizados foram caracterizados relativamente à adesão celular, morfologia celular, padrão de crescimento celular e actividade funcional osteoblástica.

2.1. Adesão celular à superfície dos implantes

As células osteoblásticas humanas foram semeadas na superfície dos seis tipos de implantes e o processo de adesão celular foi avaliado durante as primeiras 24 horas de cultura, através de Microscopia Electrónica de Varrimento. As figuras 4.11 e 4.12 mostram imagens representativas da morfologia celular após 3 e 24 horas de cultura, respectivamente. As células osteoblásticas demonstraram capacidade para aderir em todas as superfícies analisadas, como o comprova a observação de células viáveis, às 3 e 24h. Apresentam-se mais ou menos achatadas com forma alongada, sendo visíveis, ainda que em pequena quantidade, prolongamentos citoplasmáticos. Para estes tempos não se observam diferenças significativas entre as superfícies dos diferentes implantes.

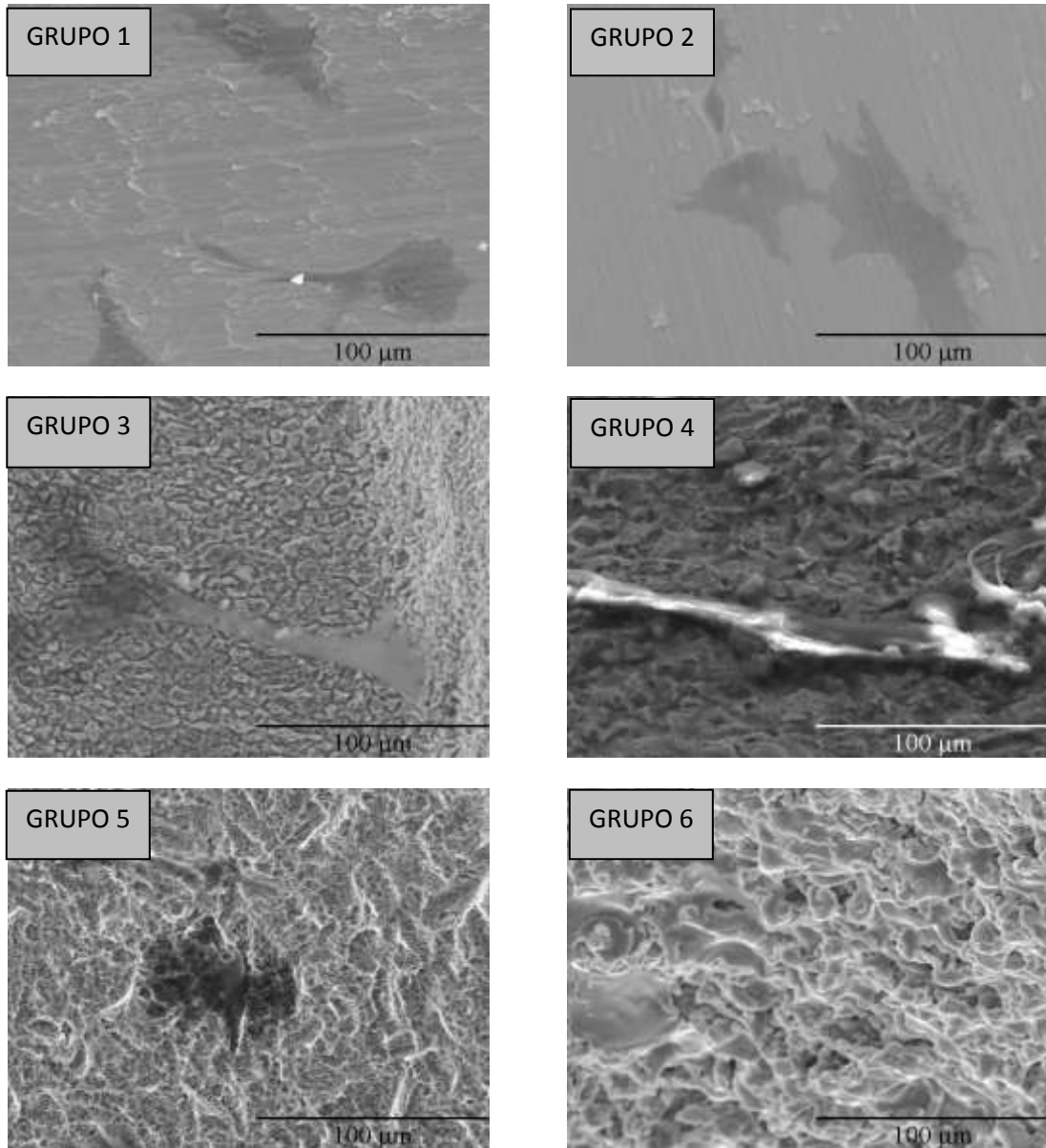


Figura 4.11 – Morfologia celular às 3h de cultura, nas seis superfícies analisadas. Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento.

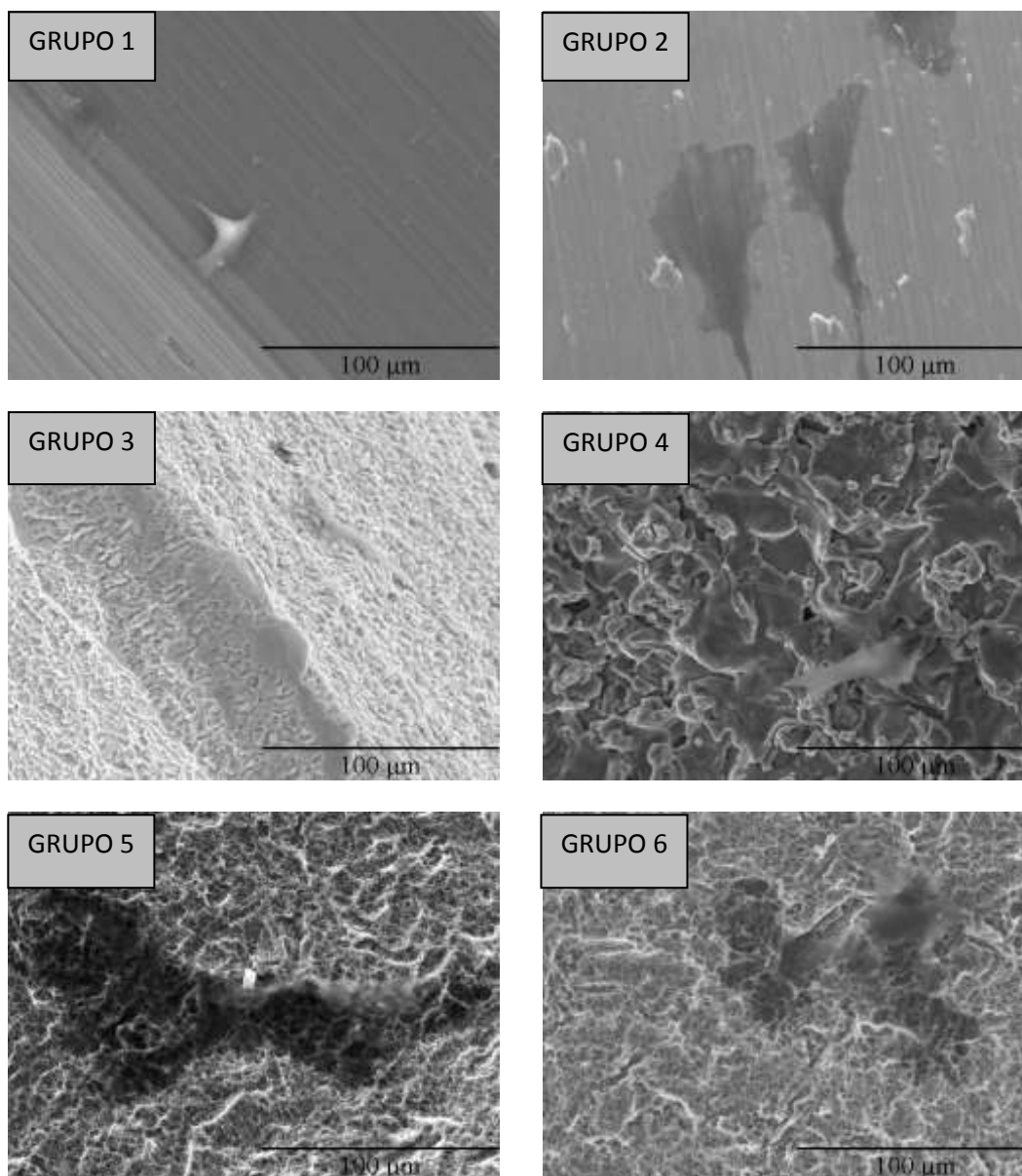


Figura 4.12 – Morfologia celular às 24h de cultura, nas seis superfícies analisadas. Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento.

2.2. Organização do citoesqueleto e morfologia celular

Os implantes colonizados com células osteoblásticas humanas foram observados por Microscopia Confocal de Varrimento Laser, após coloração imunohistoquímica para o citoesqueleto de F-actina e núcleo. As figuras 4.13 e 4.14 mostram imagens, ampliadas a 400x, da morfologia celular e organização do citoesqueleto, nos implantes mantidos em cultura por 7 e 21 dias.

Aos 7 dias de cultura, são visíveis células achatadas e com morfologia mais ou menos alongada, presença de prolongamentos citoplasmáticos e, em algumas superfícies, observam-se contactos celulares.

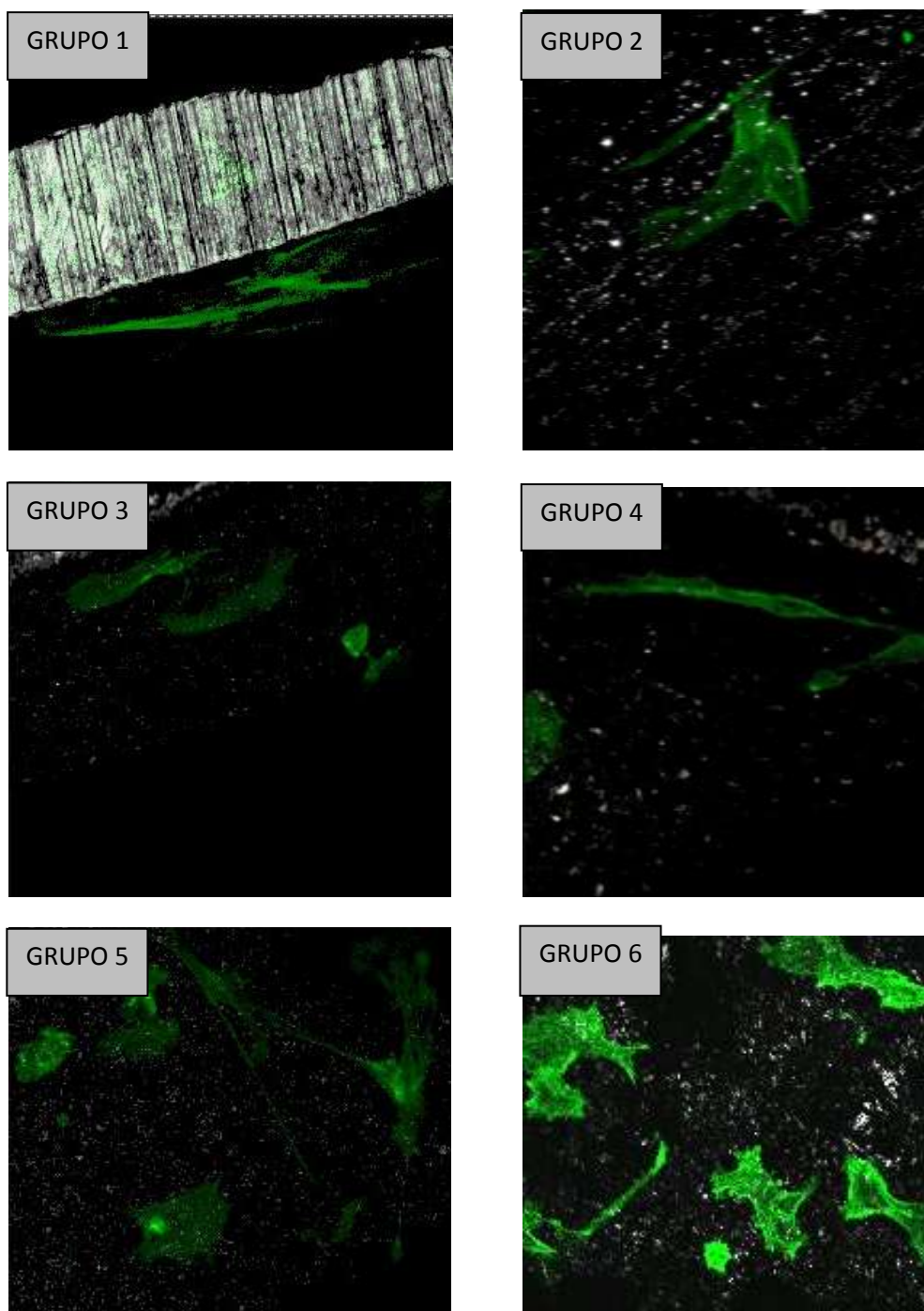


Figura 4.13 – Morfologia celular aos 7 dias de cultura, nas seis superfícies analisadas. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser (400x).

Aos 21 dias, é evidente o aumento significativo do número de células em todos os tipos de implantes. Nesta fase, as células apresentam numerosos prolongamentos citoplasmáticos e extenso contacto celular. O citoesqueleto de F-actina, que desempenha um papel fundamental na morfologia celular, apresenta uma organização que é influenciada pelas características da superfície. Assim, nos implantes dos grupos 1 e 2, as fibras de actina apresentam uma disposição mais alongada que o observado nas restantes superfícies. No entanto, as diferenças observadas na organização do citoesqueleto, e correspondente morfologia celular, estão dentro da variabilidade normal descrita para as células osteoblásticas em cultura.

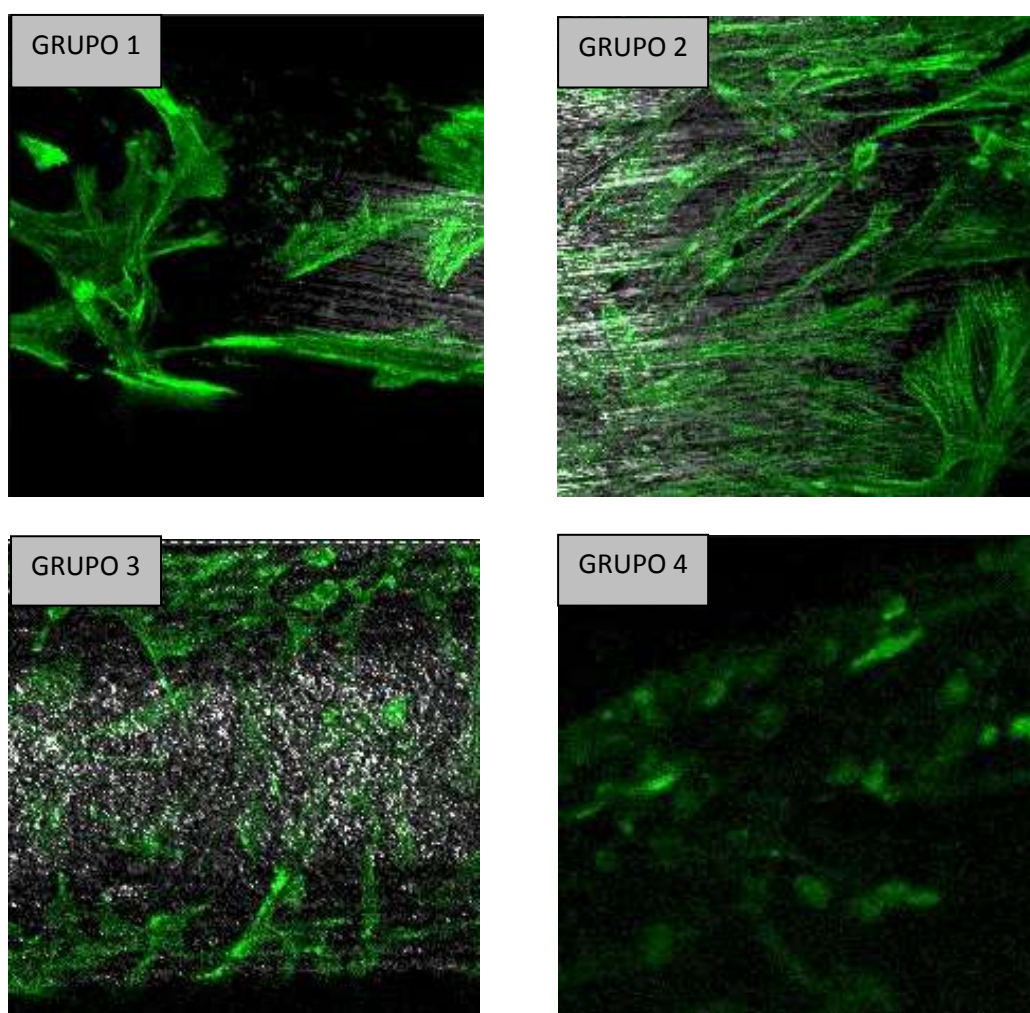


Figura 4.14 – Morfologia celular aos 21 dias de cultura, nas seis superfícies analisadas. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser (400x).

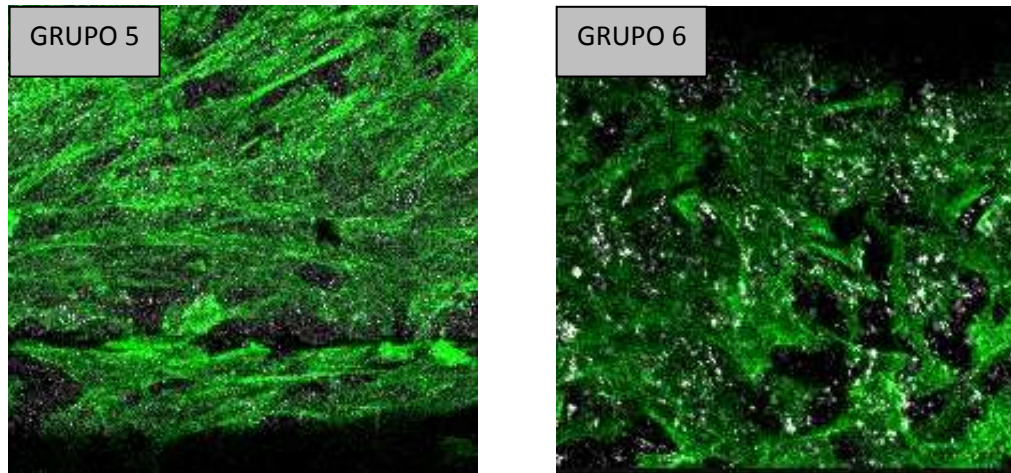


Figura 4.14 (cont.) – Morfologia celular aos 21 dias de cultura, nas seis superfícies analisadas. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser (400x).

Apesar da observação das imagens obtidas através de Microscopia Confocal de Varrimento Laser, aos 21 dias, sugerir que algumas superfícies apresentam uma camada celular mais abundante tal deve ser analisado com algum cuidado já que as imagens representam uma percentagem muito pequena da superfície dos implantes e, deste modo, são pouco representativas do comportamento da superfície total.

2.3. Padrão de crescimento celular

As figuras 4.15 a 4.20 apresentam imagens obtidas pelas Microscopia Confocal de Varrimento Laser e Microscopia Electrónica de Varrimento, relativas ao padrão de crescimento de células osteoblásticas humanas, cultivadas na superfície dos diferentes implantes, pelo período de 28 dias de incubação.

A observação dos seis tipos de implantes revelou que as células osteoblásticas aderiram à superfície dos implantes e proliferaram ao longo do tempo de cultura. Apresentaram morfologia celular normal, com prolongamentos celulares e contactos intercelulares. No dia 28 de cultura, a superfície dos implantes apresentou-se praticamente recoberta pela camada celular. As imagens obtidas através da Microscopia Electrónica de Varrimento mostram diferenças significativas relativamente ao padrão de crescimento celular nas várias superfícies.

Os implantes maquinados, pertencentes aos grupos 1 e 2, apresentam uma camada celular distribuída em forma de paliçada e um padrão de crescimento diferente nas duas vertentes, com uma orientação ao longo das irregularidades, numa das vertentes, e perpendicular às irregularidades, na outra vertente (figura 4.15 e 4.16).

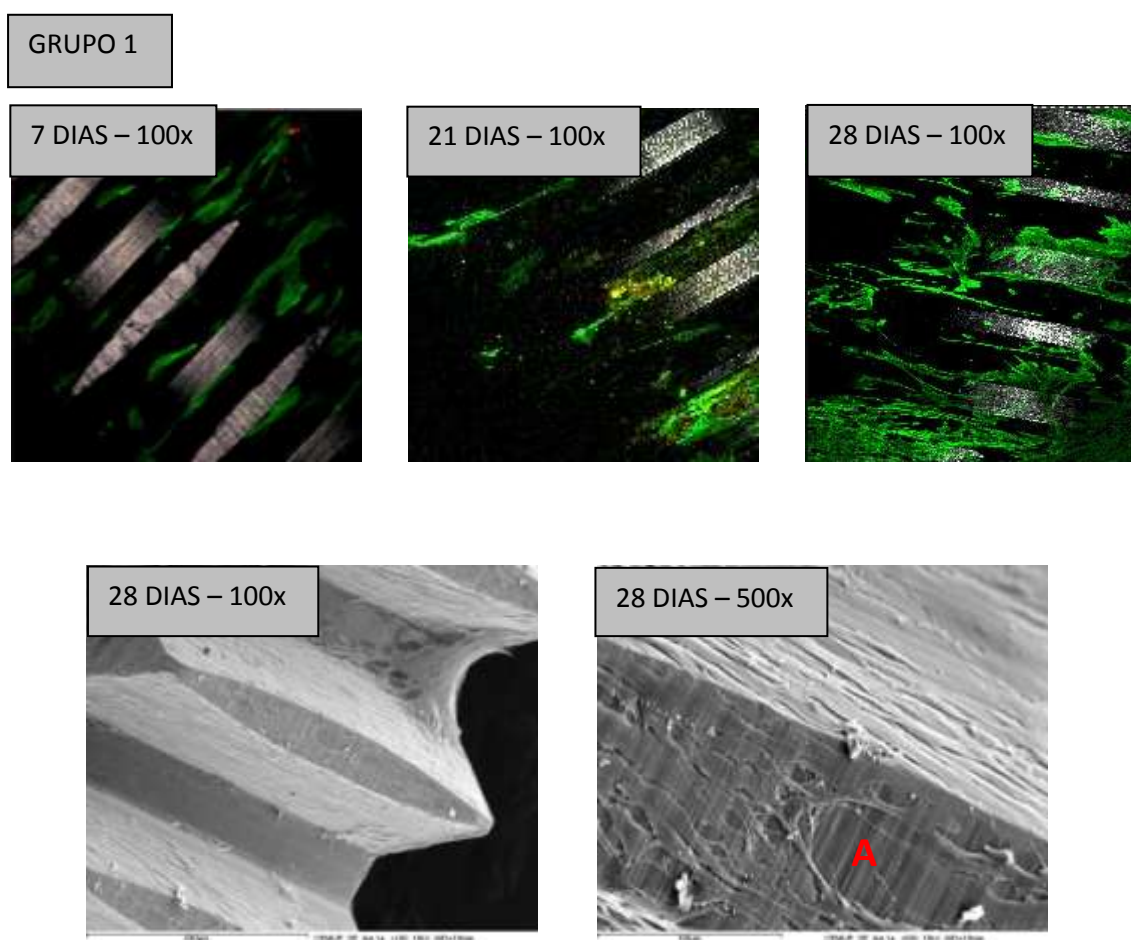


Figura 4.15 – Padrão de crescimento celular ao longo dos 28 dias de cultura. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser e MEV (100x e 500x). Grupo 1 – Implante maquinado. A – crescimento celular perpendicular à orientação das irregularidades da superfície.

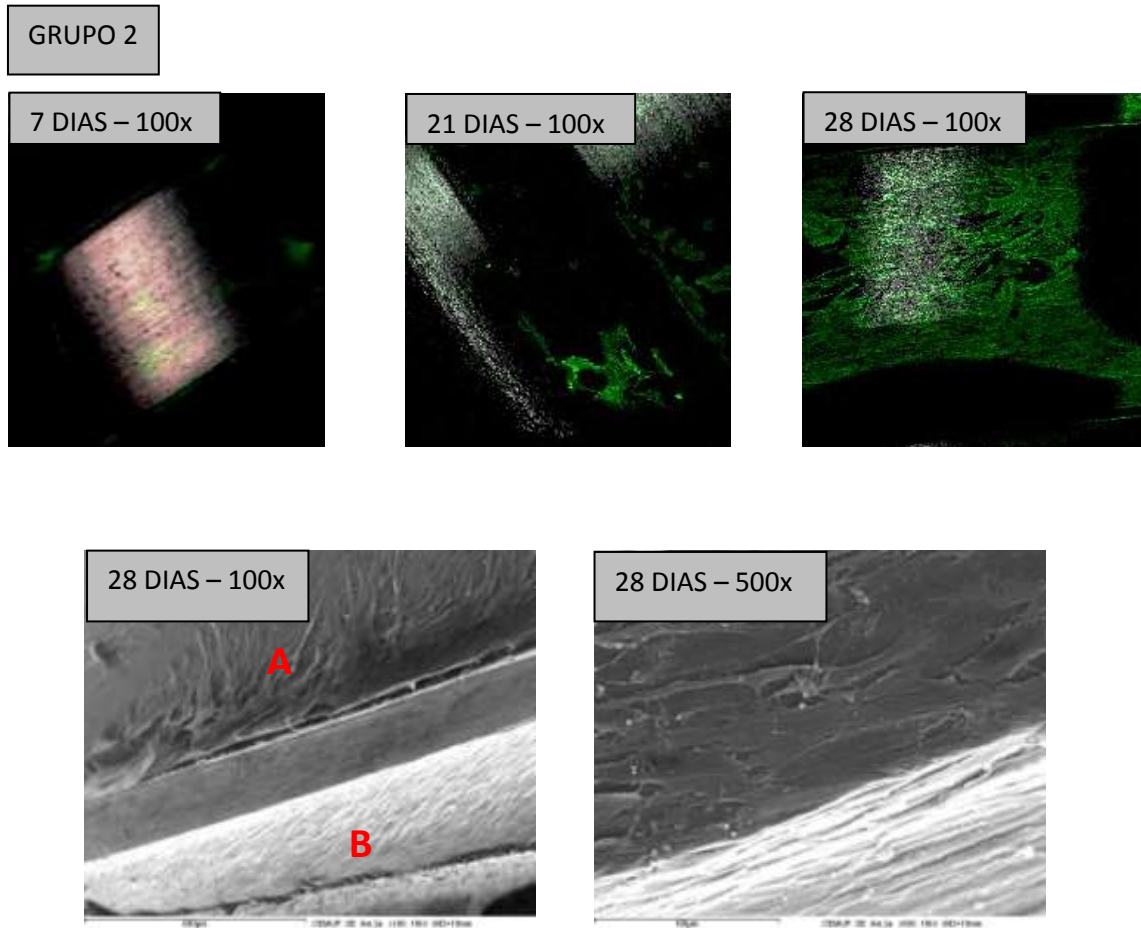


Figura 4.16 – Padrão de crescimento celular ao longo dos 28 dias de cultura. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser e MEV (100x e 500x). Grupo 2 – implante maquinado. A e B – diferente orientação do crescimento celular entre as duas vertentes visíveis.

Os implantes do grupo 3, submetidos a jactamento e ataque ácido, mostram uma distribuição celular com um elevado grau de complexidade, sendo visíveis várias camadas celulares e abundância de estruturas fibrilares (figura 4.17).

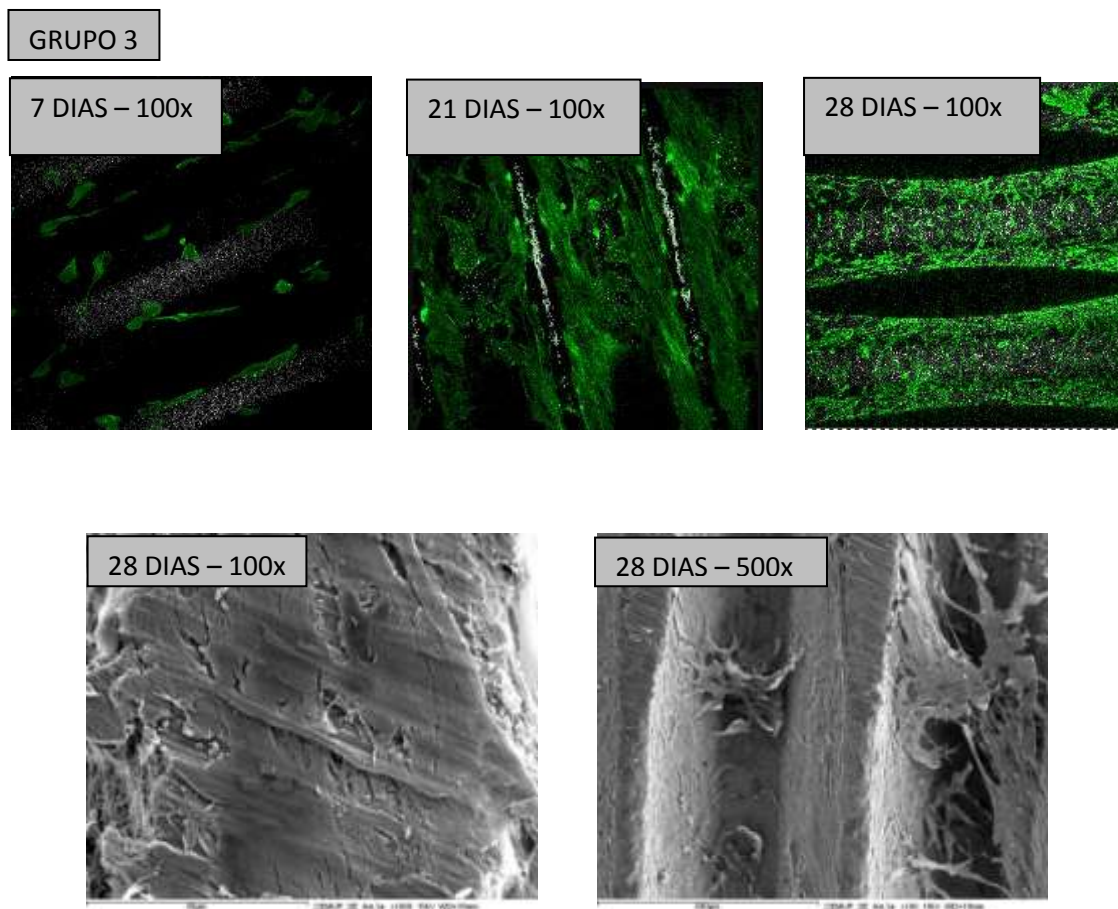


Figura 4.17 – Padrão de crescimento celular ao longo dos 28 dias de cultura. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser e MEV (100x e 500x). Grupo 3 – implante submetido a jactamento e ataque ácido.

Os implantes do grupo 4, também submetidos a jacteamto e ataque ácido, mostram uma camada de células dispostas em paliçada, apresentando as células a mesma orientação nas duas vertentes visíveis (figura 4.18).

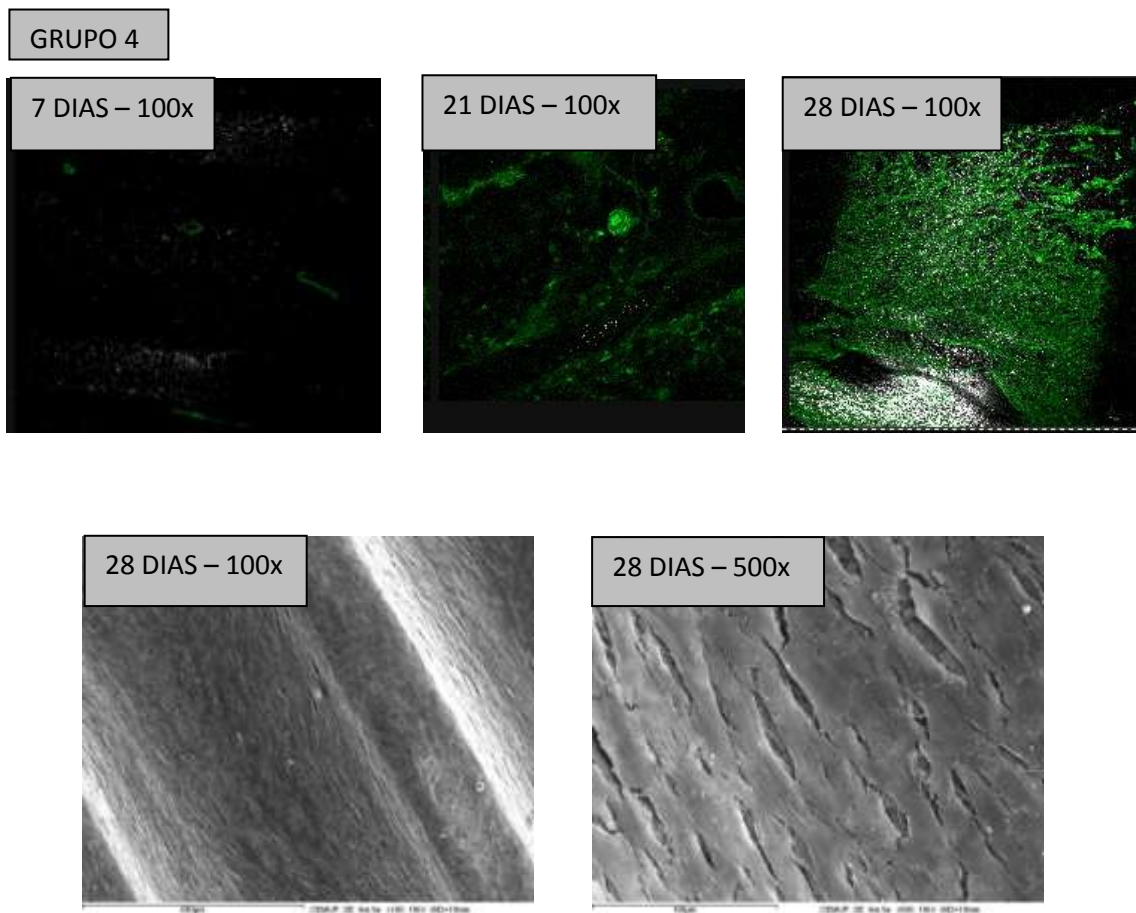


Figura 4.18 – Padrão de crescimento celular ao longo dos 28 dias de cultura. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser e MEV (100x e 500x). Grupo 4 – implante submetido a jacteamto e ataque ácido.

Os implantes do grupo 5, submetidos a jacteamento e ataque ácido, apresentam uma camada celular com um grau de complexidade elevado, com as células a emitirem prolongamentos citoplasmáticos e sendo igualmente visíveis numerosas estruturas fibrilares. Observam-se ainda sinais de destacamento da camada celular, sugerindo um padrão de crescimento rápido (figura 4.19).

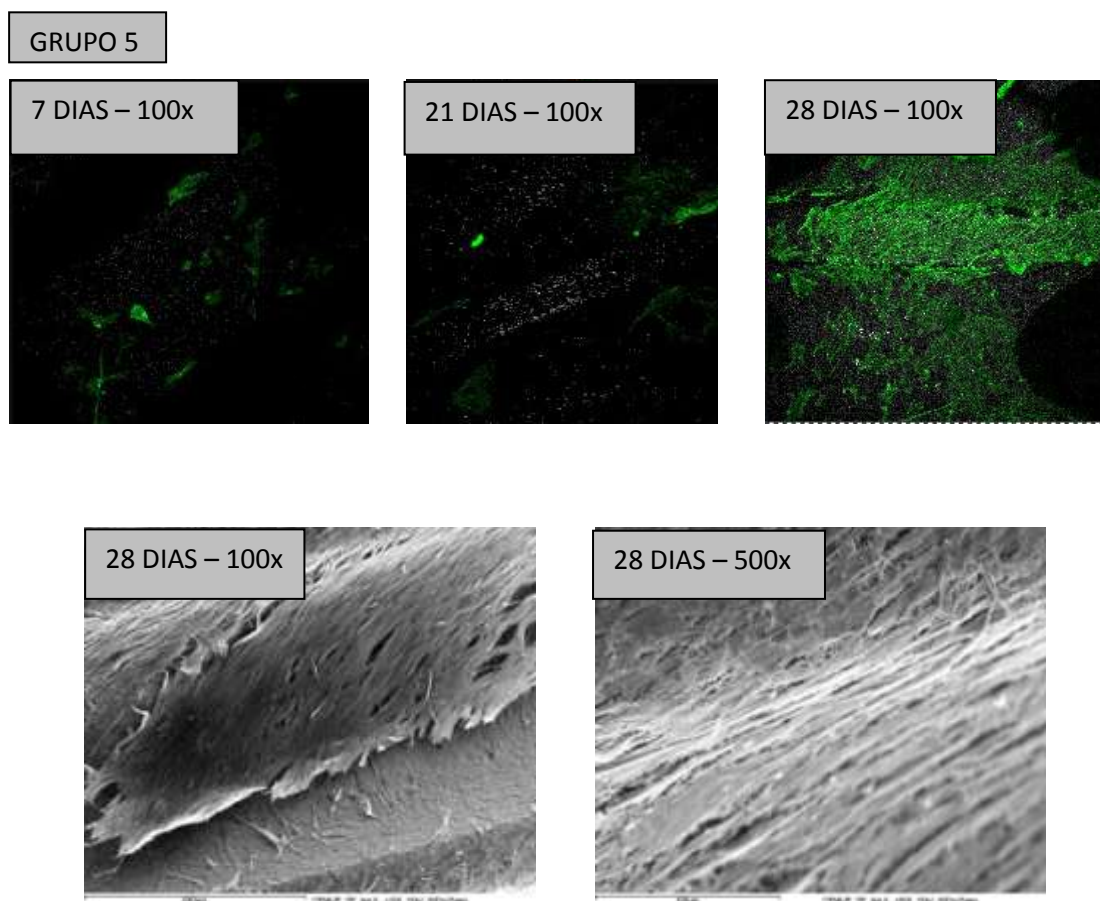


Figura 4.19 – Padrão de crescimento celular ao longo dos 28 dias de cultura. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser e MEV (100x e 500x). Grupo 5 – implante submetido a jacteamento e ataque ácido.

Os implantes do grupo 6, submetidos a bombardeamento por *spray* de plasma de titânio, apresentam uma camada de células dispostas aleatoriamente, que se adaptam às irregularidades da superfície e estabelecem numerosos contactos intercelulares (figura 4.20).

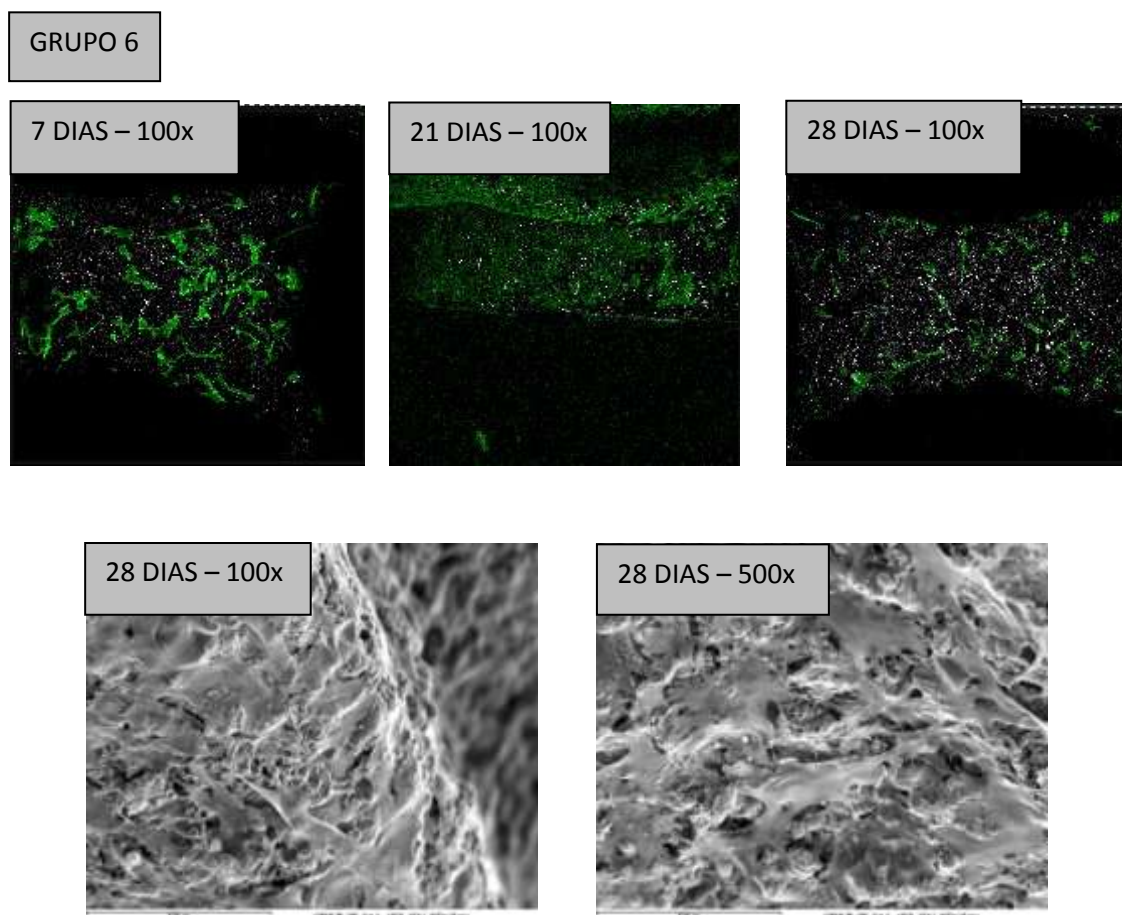


Figura 4.20 – Padrão de crescimento celular ao longo dos 28 dias de cultura. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser e MEV (100x e 500x). Grupo 6 – implante TPS.

2.4. Actividade da fosfatase alcalina

A actividade da fosfatase alcalina, presente nas culturas de células osteoblásticas efectuadas na superfície dos diferentes grupos de implantes, foi avaliada ao longo do

tempo de cultura e os resultados são apresentados no gráfico 4.27, estando expressos em $\text{nmol min}^{-1} \cdot \mu\text{g prote\i na}^{-1}$.

Durante a primeira semana essa actividade revelou-se pouco expressiva, para os seis grupos de implantes, mas a partir da segunda semana, observou-se um aumento significativo da actividade enzimática. O pico maximo da actividade foi alcançado no dia 21 para os implantes dos grupos 3, 5 e 6 e, quatro dias depois, aos 25 dias, para os implantes dos grupos 1, 2 e 4. As diferenças observadas, ao dia 21, para os implantes dos grupos 3, 5 e 6, comparativamente com os valores obtidos para os implantes do grupo 1 foram estatisticamente significativas [MANOVA ($p < 0,05$)]. Para cada um dos grupos, a partir do momento em que foi observado o pico maximo de actividade da fosfatase alcalina, os valores começaram a diminuir durante o restante tempo de cultura.

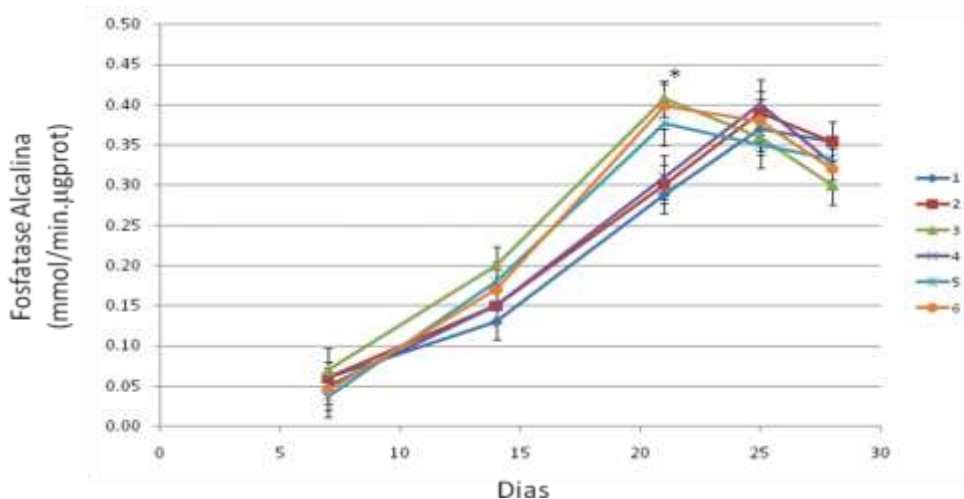


Gráfico 4.27 – Actividade de fosfatase alcalina nos seis grupos de implantes, ao longo dos 28 dias de cultura. * Diferenças com significado estatístico para os valores relativos ao implante maquinado do grupo 1 ($p < 0,05$).

Nos gráficos 4.28 a 4.31 podemos observar a actividade da fosfatase alcalina de alguns grupos de implantes, comparando-a com os resultados obtidos para os implantes do grupo 1.

No gráfico 4.28 compara-se, ao longo do tempo de cultura, a actividade da fosfatase alcalina observada nos grupos 1 e 2, ambos formados por implantes maquinados, com macroestrutura diferente. No gráfico 4.29 avalia-se, ao longo do tempo de cultura, a actividade da fosfatase alcalina observada nos implantes dos grupos 1 e 3, que apresentam macroestrutura semelhante mas com tratamento de superfície diferente. No

gráfico 4.30 compara-se, ao longo do tempo de cultura, a actividade da fosfatase alcalina verificada nos implantes dos grupos 1, 4 e 5, sendo os implantes do grupo 5 uma evolução relativamente aos implantes do grupo 4. Finalmente, no gráfico 4.31 analisa-se, ao longo do tempo de cultura, a actividade enzimática verificada para os implantes dos grupos 1, 2 e 6, sendo os implantes 2 e 6 semelhantes sob o ponto de vista de macroestrutura mas apresentando tratamento de superfície, logo microestrutura, distinta.

A actividade da fosfatase alcalina determinada para os grupos 1 e 2 é praticamente sobreponível, não havendo diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$), conforme se pode visualizar no gráfico 4.28. A actividade da fosfatase alcalina verificada no grupo 3 é mais elevada do que a observada no grupo 1 sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) aos 14 e aos 21 dias de cultura (gráfico 4.29).

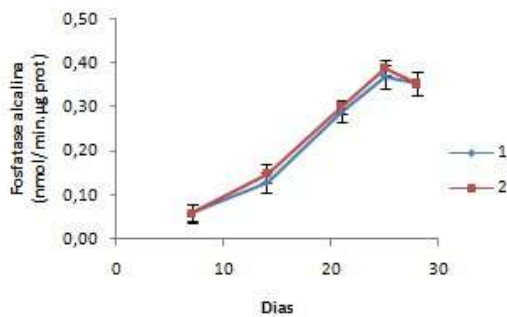


Gráfico 4.28 – Actividade de fosfatase alcalina correspondente aos implantes dos grupos 1 e 2, ao longo dos 28 dias de cultura.

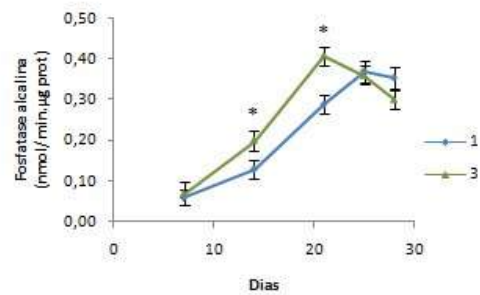


Gráfico 4.29 – Actividade de fosfatase alcalina correspondente aos implantes dos grupos 1 e 3, ao longo dos 28 dias de cultura. * Diferenças com significado estatístico para os valores relativos aos implantes do grupo 1 ($p<0,05$).

A actividade da fosfatase alcalina determinada para o grupo 5 foi mais elevada do que a observada nos grupos 1 e 4, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) aos 21 dias de cultura. A actividade enzimática verificada para o grupo 4 foi sobreponível à observada para o grupo 1, não havendo diferenças significativas entre elas ($p>0,05$) (gráfico 4.30). Finalmente, a actividade enzimática encontrada no grupo 6 foi maior do que a observada nos implantes dos grupos 1 e 2, tendo essa diferença significado estatístico ($p<0,05$) aos 14 e aos 21 dias de cultura (gráfico 4.31).

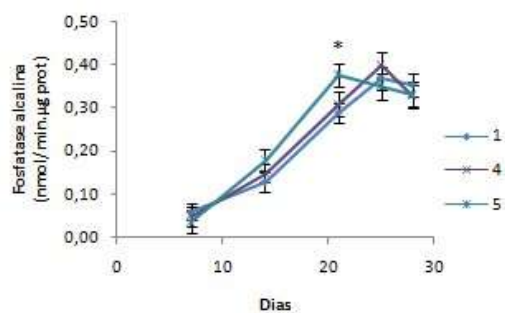


Gráfico 4.30 – Actividade de fosfatase alcalina correspondente aos implantes dos grupos 1, 4 e 5, ao longo dos 28 dias de cultura. * Diferenças com significado estatístico para os valores relativos aos implantes do grupo 1 ($p < 0,05$).

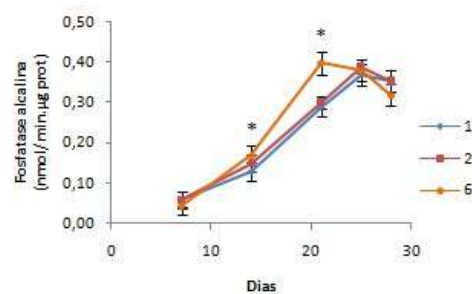


Gráfico 4.31 – Actividade de fosfatase alcalina correspondente aos implantes dos grupos 1, 2 e 6, ao longo dos 28 dias de cultura. * Diferenças com significado estatístico para os valores relativos aos implantes do grupo 1 ($p < 0,05$).

A tabela 4.17 mostra, resumidamente, a comparação entre os resultados obtidos para a actividade da fosfatase alcalina observada entre os seis grupos de implantes.

Grupos	2	3	4	5	6
1	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
2					$p < 0,05$
3					
4				$p < 0,05$	
5					
6					

Tabela 4.17 – Teste MANOVA para medidas repetidas.

2.5. Expressão génica de marcadores osteoblásticos

A figura 4.21 e o gráfico 4.32 mostram os resultados relativos à expressão génica de alguns marcadores osteoblásticos, avaliada por RT-PCR (*Reverse transcription-polymerase chain reaction*), aos 21 dias de cultura.

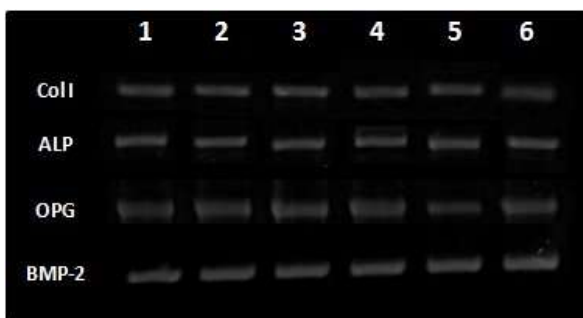


Figura 4.21 – Expressão génica de marcadores osteoblásticos, avaliada por RT-PCR, no dia 21 de cultura, nos seis grupos de implantes.

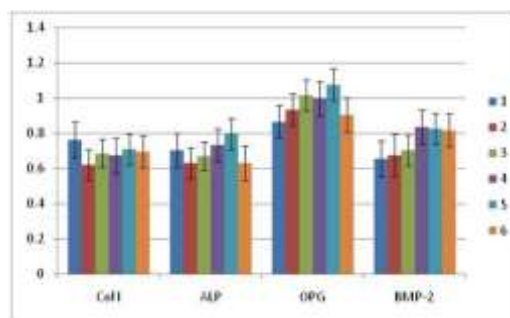


Gráfico 4.32 – Expressão génica de marcadores osteoblásticos, avaliada por RT-PCR, no dia 21 de cultura, nos seis grupos de implantes.

As culturas celulares que se desenvolveram na superfície dos implantes analisados, mostraram a expressão de genes correspondentes ao colagénio tipo I, fosfatase alcalina, osteoprotegerina e BMP-2. Na fase da cultura analisada (dia 21), não se observaram diferenças significativas na expressão dos genes que codificam estas proteínas.

2.6. Mineralização da matriz extracelular

Os implantes colonizados com células osteoblásticas foram observados através de Microscopia Electrónica de Varrimento para a visualização de depósitos mineralizados na matriz extracelular (figuras 4.22 a 4.27). Estas estruturas foram analisadas através de espectroscopia de difracção de Raios X para análise da sua composição química, procurando identificar a presença de depósitos de fosfato de cálcio (gráfico 4.33). A avaliação quantitativa do processo de mineralização da matriz foi efectuada através da determinação dos níveis de cálcio ionizado no meio de cultura, ao longo do tempo de cultura (gráfico 4.34).

A análise, através de Microscopia Electrónica de Varrimento, dos implantes colonizados, no dia 28, revelou a presença de uma camada praticamente contínua de células osteoblásticas contendo depósitos minerais de aspecto globular, em associação com a matriz extracelular. De evidenciar, no entanto, que o implante do grupo 3,

revela uma organização celular mais complexa e maior abundância de depósitos minerais, do que os restantes implantes. Em contrapartida, o implante do grupo 4 mostra a presença de uma camada celular praticamente contínua, que parece conter menor número de estruturas globulares, em comparação com o observado para os demais grupos de implantes.

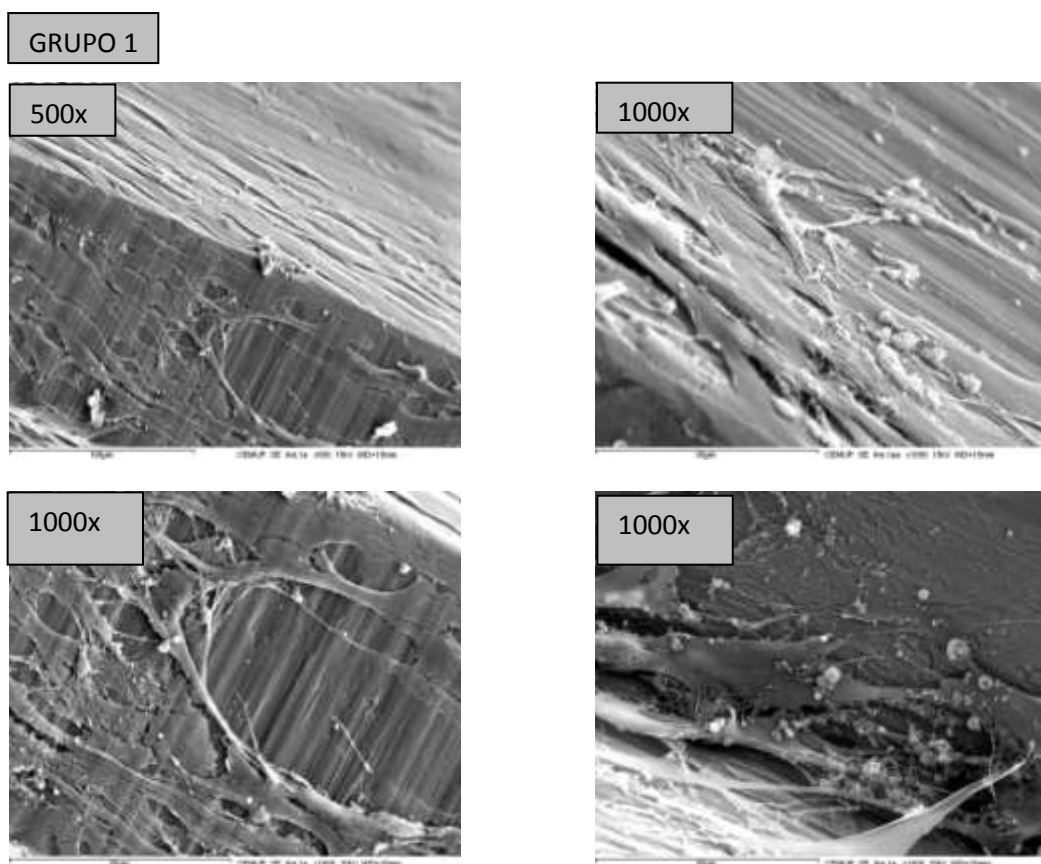


Figura 4.22 – Avaliação da mineralização da matriz extracelular em culturas com 28 dias. Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento. Implante do grupo 1 – Maquinado I.

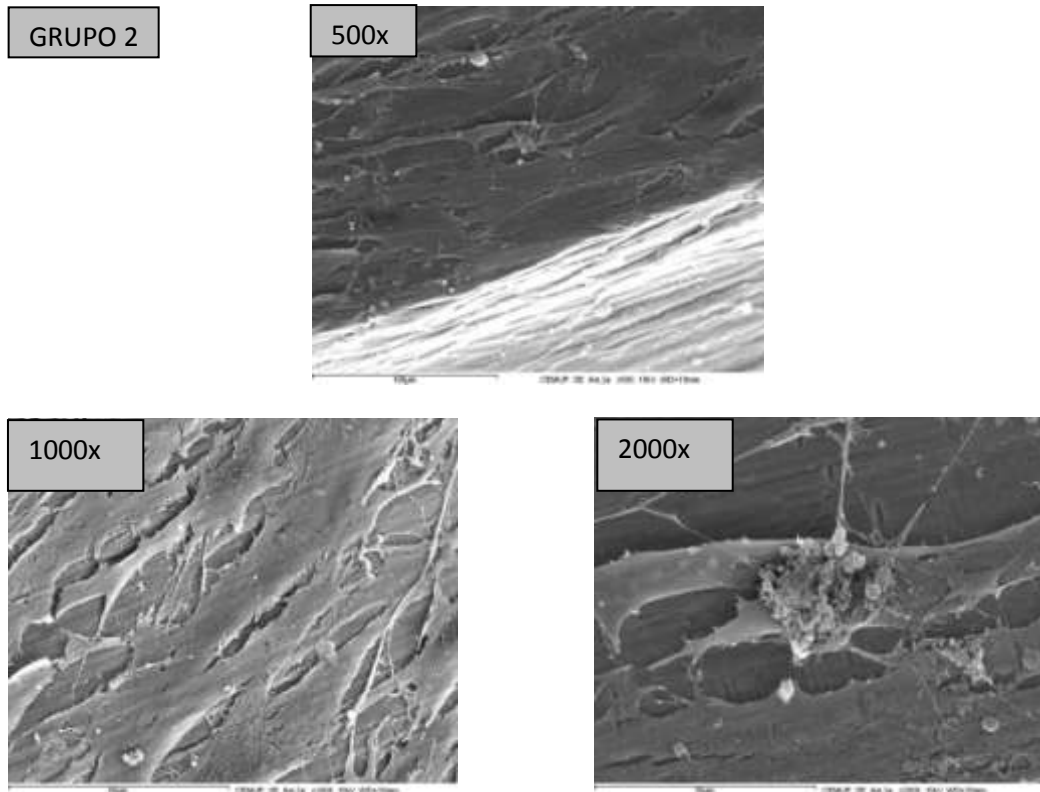


Figura 4.23 – Avaliação da mineralização da matriz extracelular em culturas com 28 dias. Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento. Implante do grupo 2 – Maquinado II.

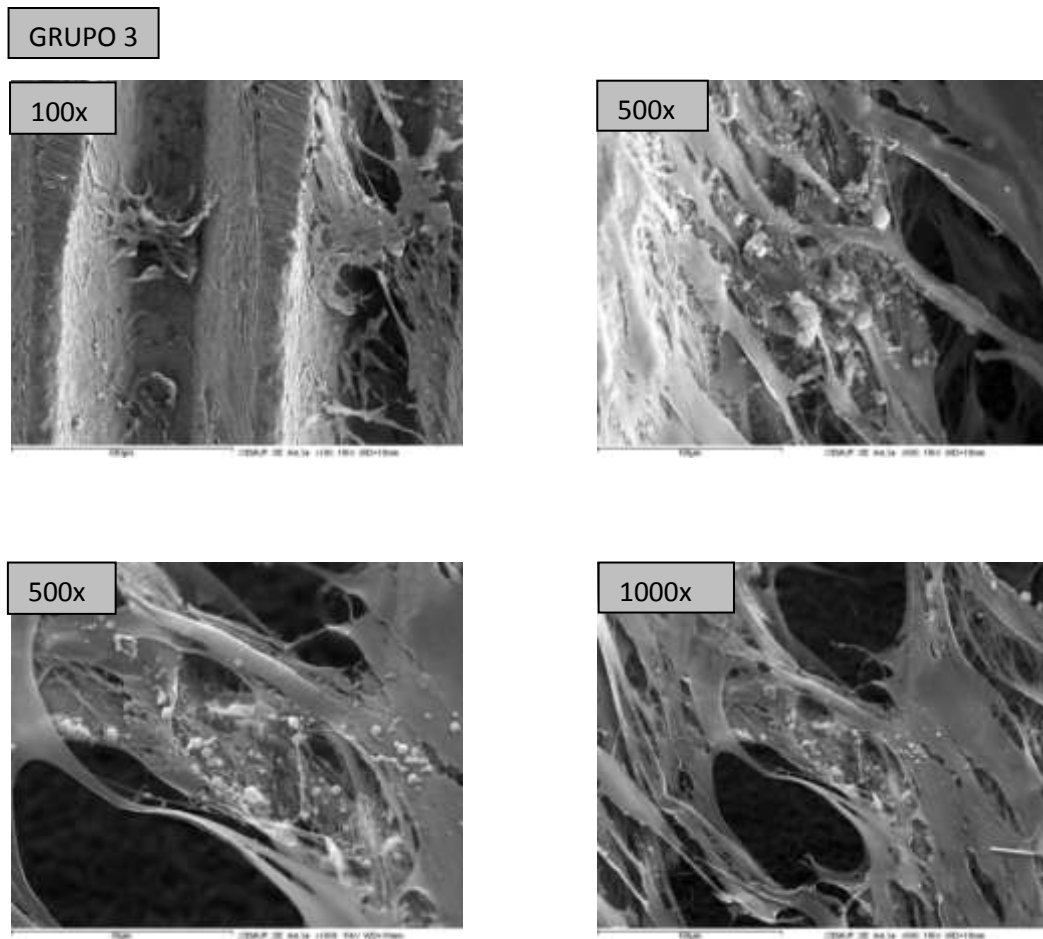


Figura 4.24 – Avaliação da mineralização da matriz extracelular em culturas com 28 dias. Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento. Implante do grupo 3 – Jactemento e ataque ácido I.

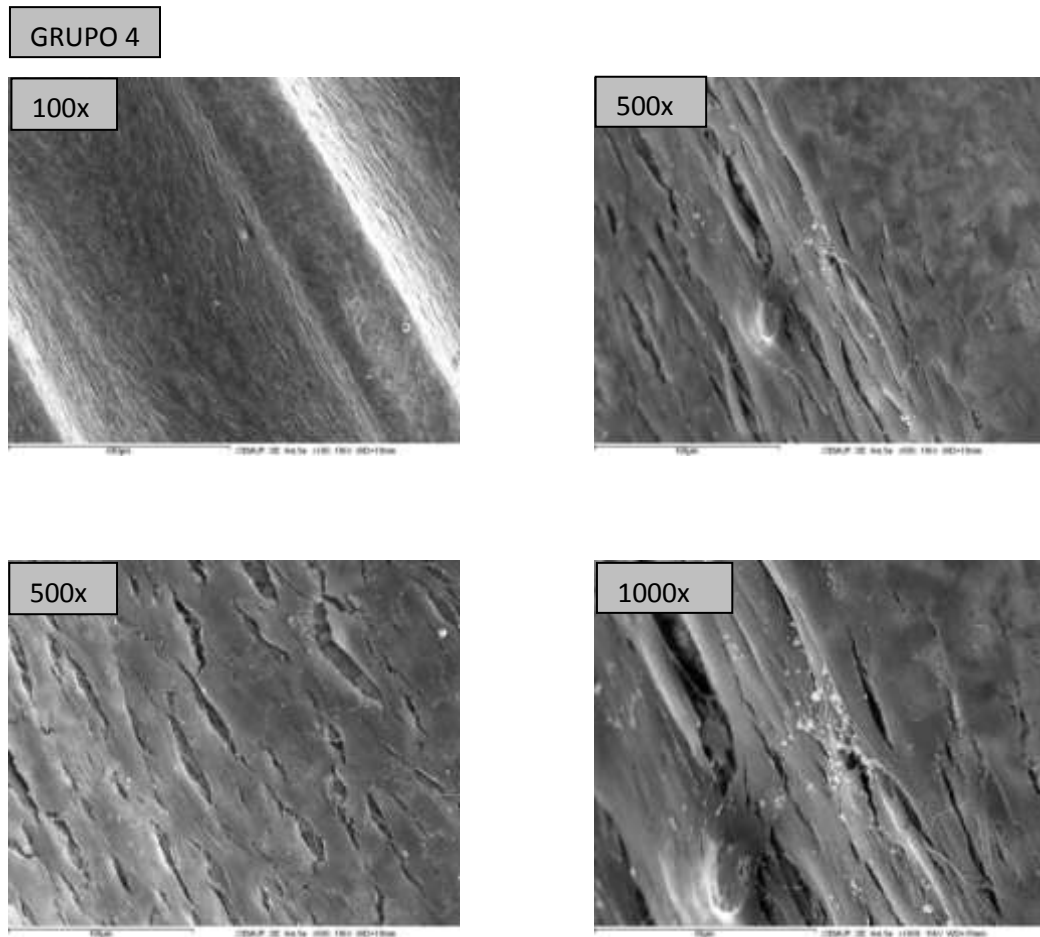


Figura 4.25 – Avaliação da mineralização da matriz extracelular em culturas com 28 dias. Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento. Implante do grupo 4 – Jactemento e ataque ácido II.

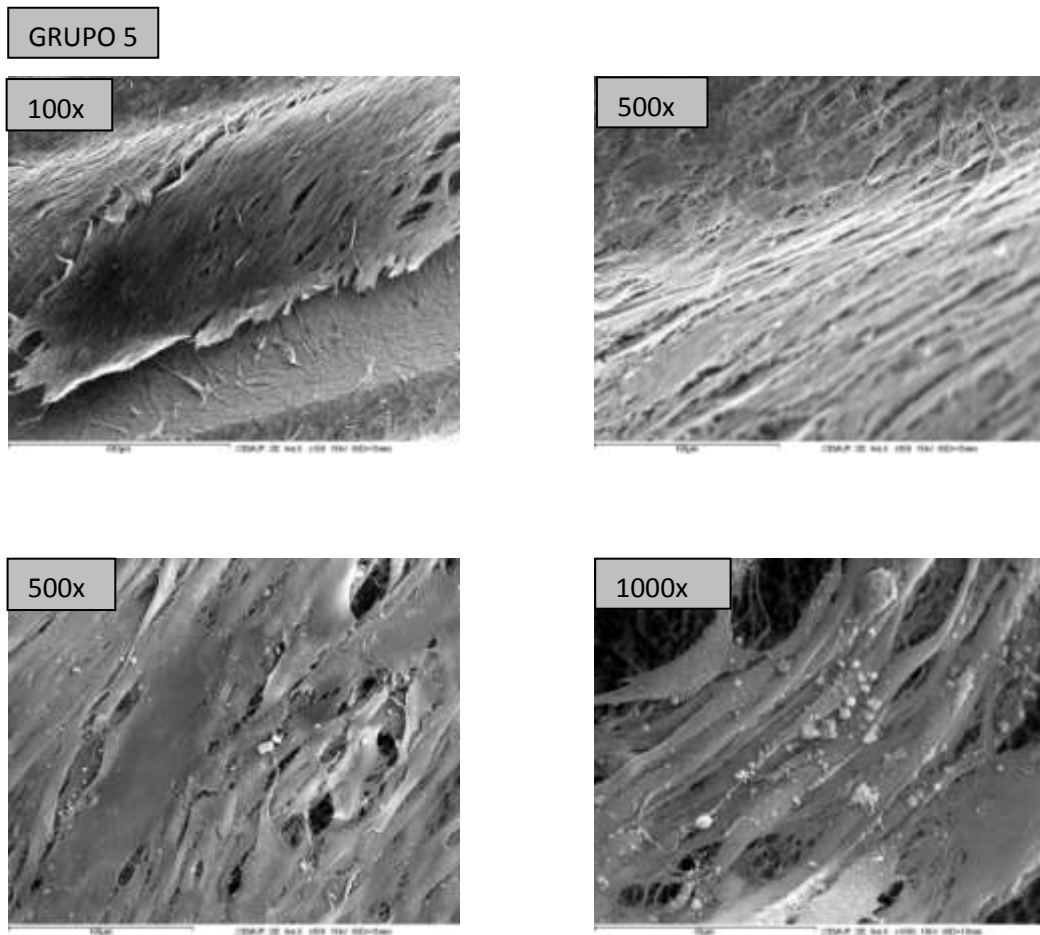


Figura 4.26 – Avaliação da mineralização da matriz extracelular em culturas com 28 dias. Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento. Implante do grupo 5 – Jacteamto e ataque ácido III.

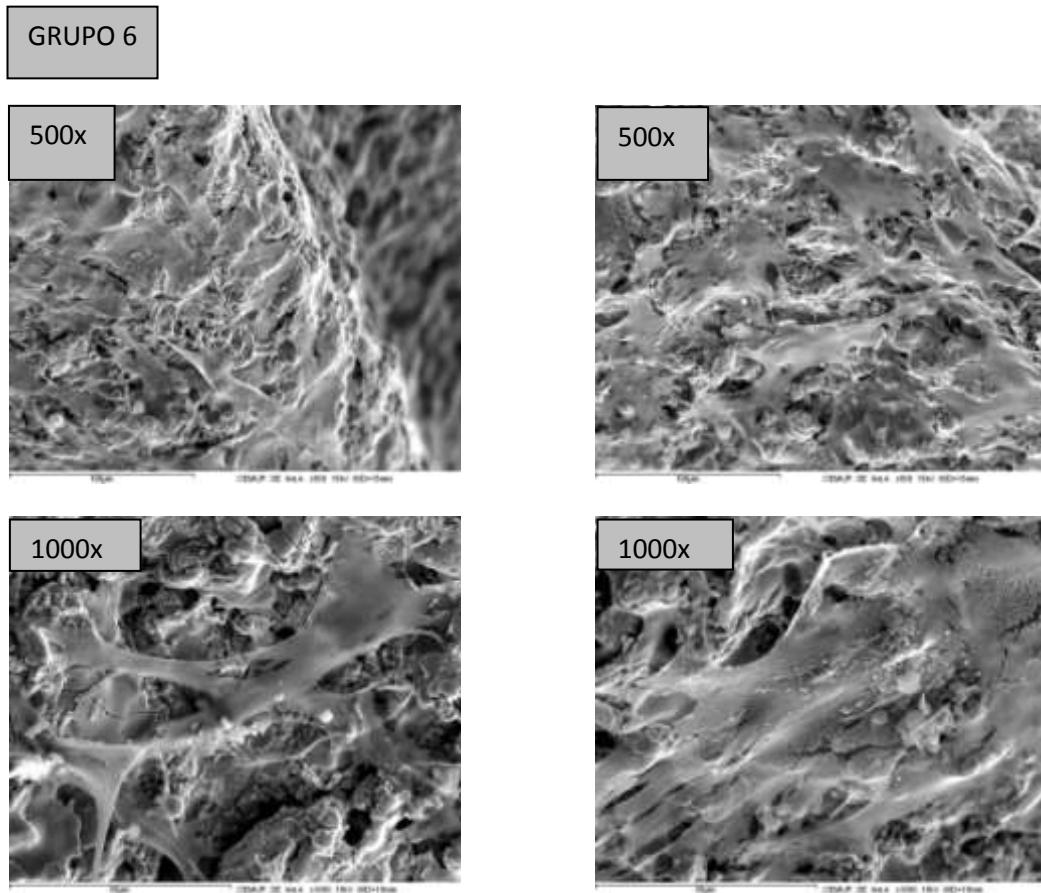


Figura 4.27 – Avaliação da mineralização da matriz extracelular em culturas com 28 dias. Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento. Implante do grupo 6 – TPS.

Através da espectrometria de difracção de Raios X é possível analisar o espectro representativo das estruturas globulares presentes nas culturas celulares. Para os seis grupos de implantes, o espectro revelou a presença de picos correspondentes ao fósforo (P) e ao cálcio (Ca) (gráfico 4.33), sugerindo que as formações globulares presentes na camada celular contêm fosfato de cálcio (figura 4.28).

Capítulo IV - Resultados

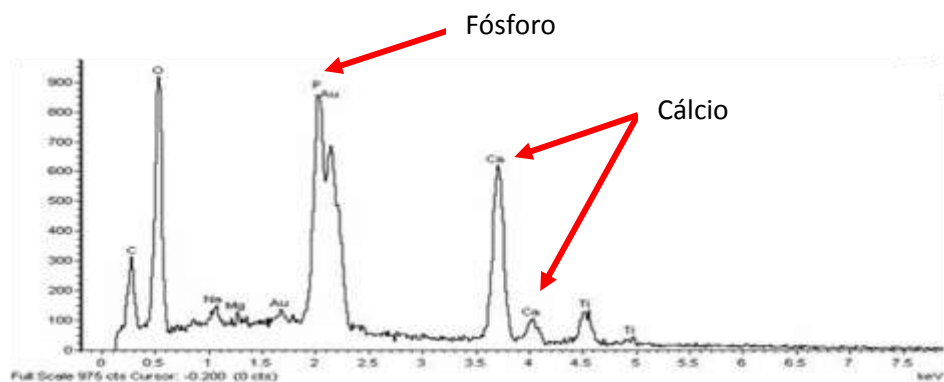


Gráfico 4.33 – Espectro de difração de Raios X representativo das estruturas globulares presentes nas culturas celulares, no dia 28 de cultura.

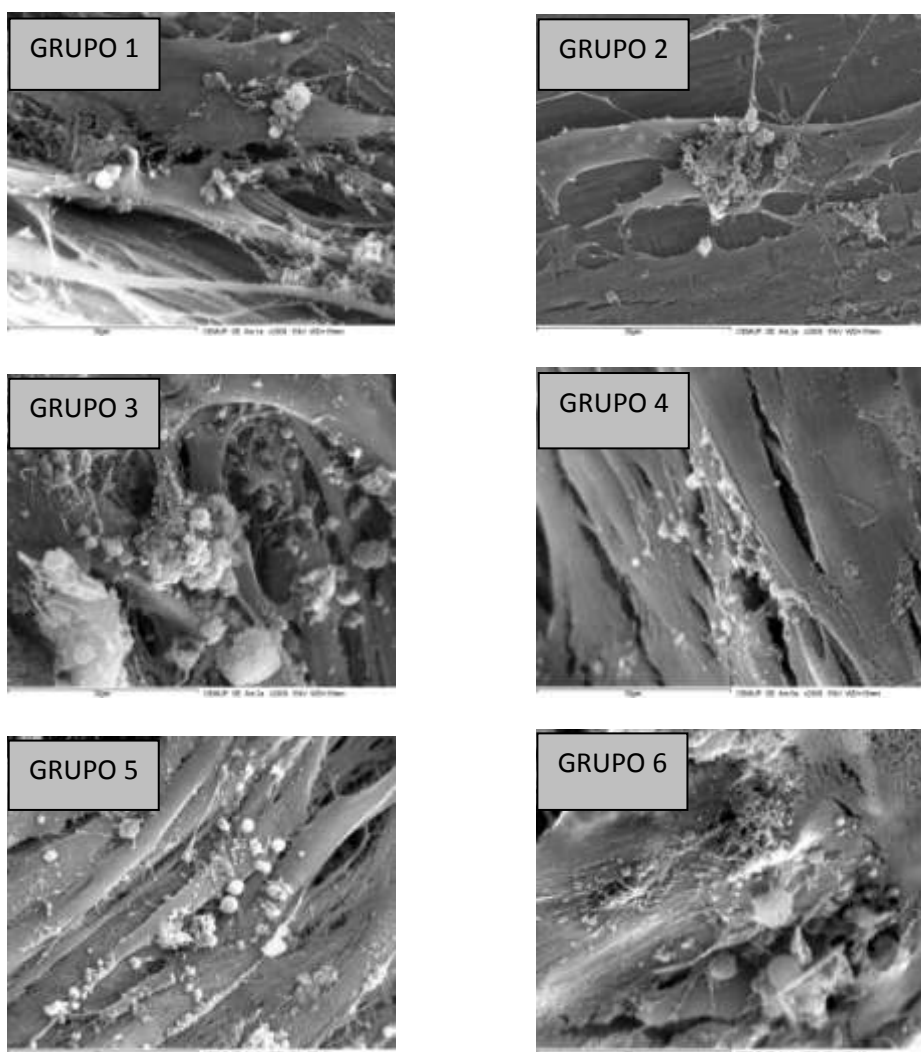


Figura 4.28 – Imagens obtidas por MEV, em grande ampliação (2.000x), da camada celular, presente na superfície dos seis grupos de implantes, no dia 28 de cultura. Observou-se a formação de depósitos globulares mineralizados, em todas as superfícies.

O cálcio e o fósforo ionizados (Ca_i e P_i , respectivamente), presentes no meio de cultura, são consumidos à medida que se vão formando os depósitos de fosfato de cálcio, na matriz extracelular. A formação destes depósitos reflecte o processo normal de mineralização.

No presente trabalho avaliou-se o consumo do Ca_i a partir do meio de cultura ao longo do tempo de incubação. Os valores reflectem as alterações verificadas entre cada mudança de meio de cultura (a cada 2, 3 dias), uma vez que, em cada mudança, o meio foi totalmente removido. Os valores não são assim, cumulativos. Os resultados apresentam-se no gráfico 4.34.

Os valores de Ca_i apresentaram-se elevados, e mais ou menos constantes, desde o início das culturas celulares, até aproximadamente ao dia 14 para o implante do grupo 3, até ao dia 16 para os implantes dos grupos 5 e 6 e até ao dia 21, para os implantes dos grupos 1, 2 e 4. A partir destes dias os valores do Ca_i começaram a diminuir, de forma mais ou menos acentuada, até aos valores mínimos, alcançados por volta do dia 30 de cultura. Estes resultados sugerem um início do processo de mineralização mais precoce no implante do grupo 3, seguido, dois dias depois, nos implantes dos grupos 5 e 6 e, um pouco mais tardio, nos implantes dos grupos 1, 2 e 4.

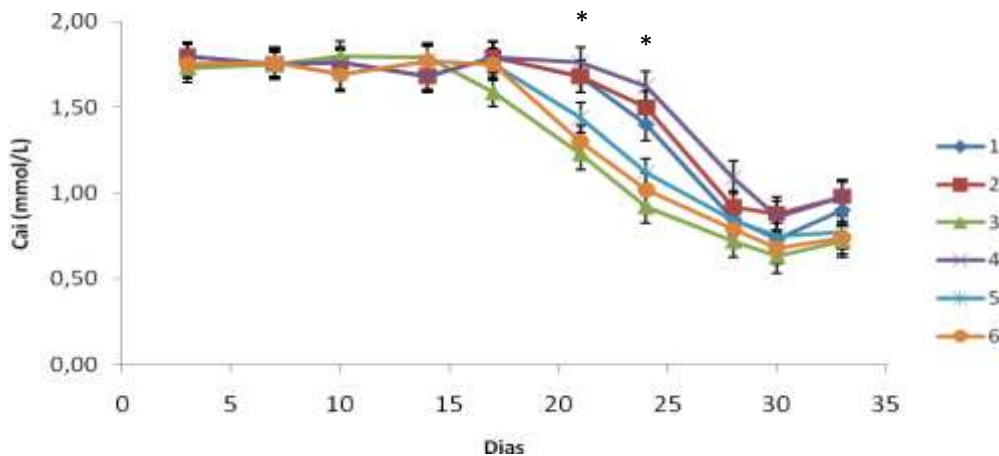


Gráfico 4.34 – Evolução dos níveis de cálcio ionizado no meio de cultura ao longo do tempo de incubação. Culturas celulares mantidas por 33 dias. * Estatisticamente diferente dos valores relativos ao implante do grupo 1 ($p < 0,05$), para os implantes dos grupos 3, 5 e 6.

Os gráficos 4.35 a 4.38 mostram a evolução dos níveis de cálcio ionizado no meio de cultura, ao longo do tempo de incubação, para alguns grupos de implantes, comparando-os entre si. Nos gráficos 4.37 e 4.38, o grupo 1 funcionou como controlo.

No gráfico 4.35 comparam-se os níveis de cálcio ionizado presente no meio de cultura, ao longo do tempo de incubação, para os implantes pertencentes aos grupos 1 e 2. Os valores observados são semelhantes e sobreponíveis, não se observando diferenças entre eles ($p > 0,05$). Os valores de Ca_i presentes no meio de cultura, ao longo do tempo de incubação, para os implantes dos grupos 1 e 3 apresentaram diferenças, aos dias 16, 21 e 25, com significado estatístico ($p < 0,05$), demonstrando um consumo de Ca_i mais precoce e mais acentuado para os implantes do grupo 3 (gráfico 4.36).

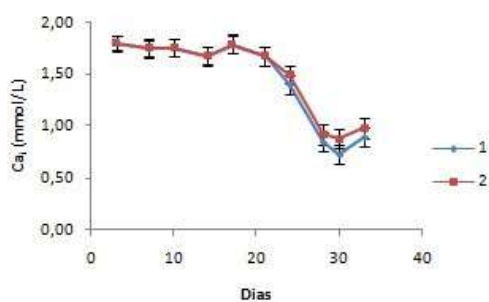


Gráfico 4.35 – Evolução dos níveis de Ca_i no meio de cultura, ao longo do tempo de incubação, para os implantes dos grupos 1 e 2.

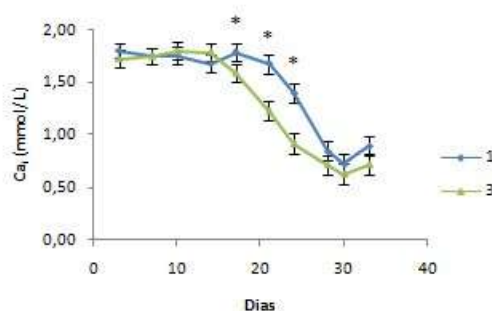


Gráfico 4.36 – Evolução dos níveis de Ca_i no meio de cultura ao longo do tempo de incubação, para os implantes dos grupos 1 e 3. * Diferenças com significado estatístico para os valores relativos ao implante do grupo 1 ($p < 0,05$).

Os valores de Ca_i observados no meio de cultura dos implantes pertencentes aos grupos 4 e 5 apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ($p < 0,05$) e relativamente ao grupo 1 ($p < 0,05$), aos 25 dias, sendo os valores observados, comparativamente ao observado no grupo 1, superiores para o grupo 4 e inferiores para o grupo 5. Essa diferença, com significado estatístico é ainda observada, no grupo 4, relativamente aos grupos 1 e 5, aos 29 dias de cultura ($p < 0,05$). Estes resultados demonstram que os implantes do grupo 5, apresentam um consumo maior e mais rápido de Ca_i comparativamente com o observado para os implantes dos grupos 1 e 4 (gráfico 4.37). O gráfico 4.38 mostra a quantidade de cálcio ionizado presente no meio de cultura,

Capítulo IV – Resultados

ao longo do tempo de incubação, considerando os grupos 1, 2 e 6. Observaram-se diferenças, com significado estatístico ($p < 0,05$), para os implantes do grupo 6, comparativamente com o observado para os grupos 1 e 2, aos dias 21 e 24 de cultura. Conforme visto anteriormente, não se observaram diferenças nos valores de Ca_i , para os implantes dos grupos 1 e 2 ($p > 0,05$).

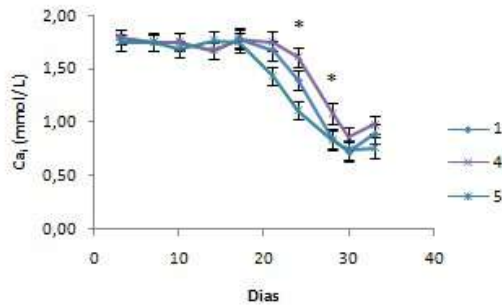


Gráfico 4.37 – Evolução dos níveis de Ca_i no meio de cultura ao longo do tempo de incubação, para os implantes dos grupos 1, 4 e 5. * Diferenças com significado estatístico para os valores relativos ao implante do grupo 1 ($p < 0,05$).

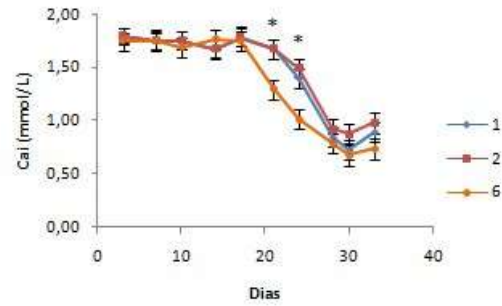


Gráfico 4.38 – Evolução dos níveis de Ca_i no meio de cultura ao longo do tempo de incubação, para os implantes dos grupos 1, 2 e 6. * Diferenças com significado estatístico para os valores relativos ao implante do grupo 1 ($p < 0,05$).

Na tabela 4.18 estão, resumidamente, expressos os resultados comparativos obtidos para o consumo do Ca_i , observado entre os seis grupos de implantes, de acordo com as comparações efectuadas.

Grupos	2	3	4	5	6
1	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
2					$p < 0,05$
3					
4				$p < 0,05$	
5					
6					

Tabela 4.18 – Teste MANOVA para medidas repetidas.

DISCUSSÃO

A osteointegração é um fenómeno complexo e multifactorial. As interacções decorrentes entre o material e os tecidos biológicos, que permitem alcançá-la, ocorrem à superfície dos implantes (53, 105, 106, 135, 152, 153, 157, 169).

Os implantes dentários endoósseos têm sido utilizados, com notório sucesso clínico, há mais de vinte e cinco anos, com uma grande variedade de materiais e desenhos (23, 62).

Presentemente, tanto quanto é do conhecimento do autor, não existe nenhum estudo científico que comprove, de forma inequívoca, que um tipo de implante, um tratamento de superfície, uma conexão protética, uma técnica cirúrgica ou uma marca comercial, ofereçam vantagens evidentes e significativas para os pacientes, sob o ponto de vista clínico, em detrimento dos restantes.

A investigação actual, na implantologia oral, centra-se maioritariamente, na optimização das superfícies implantares com vista a potenciar e acelerar a resposta osteoblástica (41, 58, 133, 234) e, deste modo, encurtar os tempos de osteointegração. Apesar de existir alguma controvérsia entre os fabricantes é, reconhecidamente aceite que muito se pode fazer ao nível das superfícies, com vista a favorecê-la (58). Um dos maiores avanços, recentes, foi o condicionamento das superfícies, segundo diferentes técnicas (34), modificando a sua microestrutura (22, 25, 33, 107, 133, 185, 234). Sabe-se que a criação de microrugosidades, bem como a incorporação de substâncias bioactivas, como por exemplo o fosfato de cálcio, iões cálcio e magnésio ou proteínas ósseas morfogénicas, pode acelerar e aumentar a formação óssea, ao redor dos implantes (30, 36-38, 97, 99, 100, 102, 103, 113). É este o grande desafio que se coloca à investigação implantológica moderna (31). Criar revestimentos de superfície cada vez mais osteogénicos capazes de promover e acelerar a formação de tecido ósseo, encurtando os tempos de osteointegração e melhorando a fixação do implante ao tecido ósseo. Por sua vez, as modificações realizadas em termos meramente mecânicos favorecem, fundamentalmente, a obtenção de uma boa estabilidade primária. Esta não deixa de ser importante para a criação de condições absolutamente fundamentais para a obtenção da osteointegração (79).

Para que um implante se osteointegre têm de ocorrer vários fenómenos que se iniciam a nível atómico e molecular passando depois para um nível celular e tecidual. Todos estes fenómenos, centrados na interface osso-implante, conduzirão à formação de tecido ósseo, desde que as condições sejam favoráveis. Neste contexto, revelam-se importantes, aspectos quer ao nível dos implantes quer ao nível do hospedeiro, que podem interferir com o fenómeno da osteointegração, de forma positiva ou negativa. No que respeita ao implante, características da sua superfície, tais como: a energia, a molhabilidade, a rugosidade e a composição química, revestem-se de elevada importância, tendo sido motivo de vários estudos (22, 25, 29, 33, 35, 90, 133). A energia de superfície e a molhabilidade determinam a aptência pelos componentes atómicos e moleculares dos sistemas biológicos que irão formar as camadas iniciais que recobrem a superfície dos implantes. Através destes elementos estabelecer-se-ão as primeiras ligações com os componentes celulares (25, 90). Superfícies com elevada energia de superfície e elevada molhabilidade constituem superfícies hidrofílicas e proporcionam uma melhor osteointegração (25). A composição química superficial é importante porque determina quais os elementos livres que, estando presentes à superfície, disponibilizarão os locais para que se estabeleçam essas ligações (24, 33). A vantagem do titânio comercialmente puro centra-se na sua elevada reactividade e na capacidade em formar uma camada de óxidos, superficial, através da qual se disponibilizam os locais para que se estabeleçam as ligações com o sistema biológico (24, 26, 75). A rugosidade determina a forma como as células interagem com a superfície, nomeadamente, como aderem e se fixam a ela (60, 86, 171, 173, 177, 181). É através destas pontes que se estabelecem entre as células osteoblásticas e a superfície dos implantes, que ocorrem as modificações celulares que irão ser responsáveis pelo despoletar de uma cascata de fenómenos que culminarão com a osteointegração. Essas acções são mediadas por receptores de superfícies, as integrinas, que induzem, numa primeira fase, modificações no citoesqueleto celular (79, 86, 160, 163, 164, 168). As características das superfícies influenciam assim, de uma forma muito directa, a resposta biológica, em todas as suas fases, desde a adsorção dos primeiros componentes dos sistemas biológicos até à mobilização, adesão, proliferação e diferenciação celular culminando com a síntese dos constituintes da matriz extracelular e a sua mineralização (27, 52, 129, 167, 173, 177, 179, 181, 186).

Rugosidade e composição química de superfície têm sido muito estudadas (18, 25, 55, 56, 60, 77, 87, 88, 158, 169, 171, 173, 177, 181, 187, 196, 198, 235), embora a importância da segunda ainda seja, muitas vezes, secundarizada em relação à primeira. Apesar disso, é hoje unanimemente aceite a importância de ambas na resposta biológica desencadeada, após implantação.

Os osteoblastos respondem à microarquitetura da superfície dos implantes. Em superfícies lisas as células aderem e proliferam mas exibem níveis de diferenciação osteoblástica menores do que os observados quando na presença de superfícies mais rugosas. Nestes últimos casos, a proliferação é menor e as células respondem melhor e de forma mais intensa aos factores de crescimento, às citocinas, à vitamina $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e à hormona 17β -estradiol. Também produzem mais factor TGF- β 1, factor que promove a osteogénese, de forma autócrina e parácrina, ao mesmo tempo que inibe a acção osteoclástica. A resposta dos osteoblastos às superfícies é mediada por receptores de superfície denominadas integrinas que sinalizam as diferentes acções celulares por modificação da estrutura do citoesqueleto celular (53, 105, 175).

É, assim, importante que as superfícies implantares apresentem características favoráveis capazes de estimular e potenciar a resposta biológica.

Para além das características dos implantes, também as características dos hospedeiros desempenham um papel importante no mecanismo da osteointegração (236). Factores relacionados com a resposta inflamatória, que inevitavelmente se desencadeia, numa fase inicial, com o estabelecimento da microcirculação local, a mobilização celular, a reabsorção do osso necrosado e o estabelecimento de uma resposta eficaz mediada por factores autócrinos e parácrinos, reguladores da osteogénese, dos quais desempenham papel crucial o TGF- β 1, a PGE_2 e a vitamina D, são importantes e próprios de cada organismo (53, 105, 135, 175).

Dada a evolução da implantologia oral e apesar de, presentemente, a investigação, nesta área, ser abundante, é globalmente aceite, pela comunidade científica, que são necessários mais estudos *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos utilizando implantes com diferentes tipos de superfície para compreender um fenómeno que, ainda hoje, continua a suscitar algumas dúvidas (33, 65, 106, 124, 132).

Tem sido realizada muita investigação *in vitro* com o objectivo de analisar a biocompatibilidade e a segurança biológica dos materiais. As primeiras fases da osteointegração, quer ao nível atómico/molecular, quer ao nível celular são cruciais para se entender o processo de formação óssea, após colocação de implantes. Este tipo de investigação apresenta como principais vantagens o seu custo, inferior ao verificado na investigação *in vivo*, a capacidade de controlo dos factores de confundimento, a sua rapidez de execução e o facto de não suscitar os mesmos problemas éticos e de direitos dos animais que, inevitavelmente, desperta a experimentação animal *in vivo* (66, 210, 213, 237). Apesar disso, também comporta alguns problemas, estando os principais relacionados com o tipo de culturas celulares utilizadas, a sua origem e grau de maturação, o facto de as experiências serem feitas com um único tempo de sementeira, num princípio de “tudo ou nada”, e de se utilizarem concentrações celulares elevadas,

induzidas laboratorialmente. As diferentes origens que podem ter as células utilizadas na experimentação *in vitro*, são relevantes porque se podem observar diferenças quantitativas e/ou qualitativas nas suas respostas devido a uma reduzida capacidade proliferativa ou a uma sensibilidade a estímulos, diferente (175, 188, 220). Um outro aspecto, igualmente importante, é o facto de, muitas vezes, os resultados não poderem ser extrapolados para a experimentação *in vivo*, uma vez que reflectem uma reacção celular individual e não uma reacção tecidual, tal como acontece em termos clínicos (66, 210, 213, 237). A própria experimentação animal apresenta algumas especificidades que também podem condicionar essa extrapolação para o ser humano (211).

Apesar de apresentar algumas condicionantes trata-se de uma forma de investigação que constitui um marco importante no estudo dos implantes, devendo contudo, os seus resultados serem analisados de forma cuidadosa e como complemento à investigação *in vivo*, sempre que realizada. Várias são as linhagens celulares utilizadas (29, 188), com diferentes graus de maturação, sendo as mais utilizadas em implantologia oral as células da calvária de feto de rato (FRC), as células MG63, provenientes de osteosarcomas humanos, as células adultas derivadas da calvária de ratos transgénicos (OCT-1), as células provenientes de ratos transgénicos (MLO-Y4) e ainda as células provenientes de medula óssea humana.

No nosso trabalho, optamos pela utilização de células derivadas da medula óssea humana, contendo células indiferenciadas, procurando recriar, o mais aproximadamente possível, o ambiente que se verifica na prática clínica, conforme referem Mailhot e Borke (214). Estas células, mediante estímulos apropriados, irão diferenciar-se em osteoblastos, caso contrário formar-se-ão fibroblastos que conduzirão ao fracasso (217). Em condições *in vivo*, a vascularização e a tensão de oxigénio na zona implantada, quando favoráveis, bem como, a ausência de micromovimentos, nas primeiras fases, proporcionam as condições necessárias para que prevaleça a diferenciação osteoblástica (162, 188). Na experimentação *in vitro*, essa sinalização é proporcionada pela incorporação, no meio de cultura, de ácido ascórbico, β -glicerofosfato e dexametasona (232).

Apesar de não se saber em rigor, qual a melhor superfície, é hoje aceite que rugosidades moderadas, da ordem dos 1 a 2 μm , são as ideais e as que desencadeiam as respostas biológicas mais favoráveis (58). Estes valores estão relacionados com a dimensão dos osteoblastos, com a forma como se dispõem à superfície do implante, como organizam o seu citoesqueleto e como emitem os prolongamentos citoplasmáticos que irão estabelecer as pontes, entre eles e as irregularidades da superfície, modelando a osteogénese (86, 182, 188). Superfícies lisas induzem, nos osteoblastos, um fenotipo do tipo fibroblástico (175). Por sua vez, superfícies com irregularidades excessivas, também induzem um comportamento semelhante, devido ao grande afastamento que as

irregularidades apresentam entre si (29). Este é o motivo pelo qual os fenômenos que ocorrem na interface entre o implante e o sistema biológico são melhor percebidos ao nível micrométrico.

Há vários trabalhos, *in vitro* e *in vivo*, que atestam um crescimento mais favorável de células osteoblásticas e a correspondente formação de osso, quando em contacto com superfícies que apresentam rugosidade moderada, comparativamente com superfícies lisas ou extremamente rugosas (28, 55, 56, 87, 173, 177, 181, 187, 189, 235).

Galli e colaboradores (27) analisando, *in vitro*, o comportamento de osteoblastos humanos em duas superfícies de titânio, distintas, uma produzida por *spray* de plasma de titânio e outra de SLA (**S**andblasted, **L**arge grit, **A**cid-etched) observaram diferenças significativas tendo concluído que a segunda proporcionava uma maior diferenciação das células. Verificaram crescimento celular em ambas as superfícies, embora mais rápido, na superfície SLA, provavelmente proporcionando uma cicatrização mais precoce. Apesar disso, observaram uma menor adesão inicial nesta superfície. Contudo, não foram observadas diferenças significativas no que diz respeito a diferentes marcadores osteoblásticos.

Guizzardi e colaboradores (170) analisando a influência de seis superfícies distintas, de titânio, na resposta desenvolvida por osteoblastos humanos, verificaram que os melhores padrões de crescimento e diferenciação eram alcançados para superfícies com rugosidade média próxima de 1,5 μm . Concluíram que, para além deste aspecto, provavelmente também a profundidade, a morfologia, a distribuição e a orientação das irregularidades, bem como a presença ou não de contaminantes resultantes dos procedimentos e acabamentos, desempenhassem um papel importante na resposta celular.

Cooper e colaboradores (52) demonstraram a influência da topografia de superfície no comportamento celular nomeadamente em fases mais avançadas, isto é, na fase da síntese de proteínas ósseas específicas da matriz celular e no processo de mineralização da matriz, em culturas celulares desenvolvidas em superfícies maquinadas, superfícies jacteadas com óxido de titânio e superfícies revestidas a *spray* de plasma de titânio. Concluíram que a topografia modela a diferenciação osteoblástica com vantagem para as superfícies com rugosidade moderada.

Gebran e Wassal (238) verificaram excelente desempenho, *in vitro*, para a adesão de células provenientes do osso parietal de ratos *newborn*, em implantes com superfície tratada por ácidos.

Devido ao conhecimento da importância que a rugosidade desempenha no comportamento dos implantes, tem sido estratégia da maioria das casas comerciais, o

tratamento e a preparação das superfícies, de modo a potenciar ao máximo as suas características e, desta forma, conseguir-se uma melhor e mais rápida osteointegração. Vários são os tratamentos de superfície, a que os implantes podem ser sujeitos (34, 71, 107).

Durante algum tempo foram utilizados implantes com rugosidades extremas. Por um lado, os maquinados, com rugosidades muito baixas e, por outro, os revestidos por *spray* de plasma de titânio ou hidroxiapatite, com rugosidades muito elevadas (34, 38, 77, 108). Recorde-se, a título de curiosidade, que os primeiros implantes utilizados por Brånemark eram maquinados. Ambos comprovadamente osteointegravam (20, 52, 56, 97, 108) e a evolução dos maquinados para os implantes TPS ou revestidos a hidroxiapatite, permitiu que, clinicamente, fosse possível utilizar implantes com menores dimensões do que as que eram inicialmente recomendadas, com tempos de cicatrização menores (234). Com o tempo, e com base em diversos estudos, *in vitro* e *in vivo* (95, 235, 239, 240), a comunidade científica foi percebendo que as rugosidades associadas aos melhores resultados biológicos e clínicos eram as que apresentavam valores intermédios e que o melhor método para as conseguir era através do tratamento das superfícies com recurso ao jactamento, com partículas de granulometria média/alta, de modo a criar irregularidades grosseiras, seguido da imersão em ácidos, com protocolos específicos de temperatura, pressão e duração, cujo objectivo seria o de atenuar essas irregularidades, tornando-as mais pequenas, ao mesmo tempo que se eliminavam os contaminantes das superfícies (34). Presentemente, esta tem sido a linha orientadora da generalidade dos fabricantes, diferindo entre eles o protocolo e os produtos envolvidos, apresentando actualmente, a generalidade dos implantes, este tipo de superfícies (41, 71). Naturalmente que, fruto da pressão comercial, cada fabricante vai introduzindo uma ou outra modificação no protocolo e na composição química da superfície, de modo a procurar garantir a liderança comercial (241). Hoje em dia, dá-se particular atenção à incorporação de flúor nas superfícies implantares pois verificou-se ser favorecedora do processo de osteointegração (11, 95, 96, 131, 167).

A rugosidade de superfície é reconhecidamente uma característica muito importante nas interacções material-atómos/moléculas, material-célula e material-tecido, durante o fenómeno da osteointegração.

Apesar de, na generalidade das vezes, os tratamentos de superfície visarem alcançar as rugosidades consideradas mais adequadas, o certo é que também interferem com a composição química da superfície, local onde ocorrem todos os fenómenos moleculares e celulares que conduzem à osteointegração (33, 60, 231).

A composição química, particularmente a da superfície, também desempenha um papel importante na osteointegração já que as ligações celulares se estabelecem, inicialmente a um nível atômico, através dos componentes químicos, presentes à superfície, nomeadamente os elementos titânio e oxigénio (24, 77, 198). Presentemente, a generalidade dos implantes dentários utiliza, na sua confecção, titânio comercialmente puro, material biocompatível e com excelentes propriedades mecânicas (26, 75). Trata-se de um material que, para além destas qualidades, apresenta ainda a enorme vantagem, suplementar, de, sendo muito reactivo, formar à superfície, de forma espontânea, uma camada de óxido de titânio, maioritariamente formada por dióxido de titânio (17, 24, 75, 92, 228). Esta camada, que vai aumentando com o tempo, mesmo após implantação, tem a particularidade de proteger o implante de fenómenos corrosivos e de diminuir a dissolução e degradação do material, com a conseqüente libertação de iões para o meio envolvente, susceptíveis de prejudicar a resposta biológica (17, 76, 242). Para além disso, proporciona os locais onde se estabelecerão as pontes com os componentes dos sistemas biológicos (24). A composição química do núcleo dos implantes pode diferir significativamente da composição química da superfície devido aos efeitos causados pelos diferentes procedimentos empregues no decurso do fabrico dos implantes (77, 88, 198, 230). Devido à formação desta camada superficial, a percentagem máxima, teórica, expectável, de titânio, à superfície, é de 33%, sendo os restantes 66%, formados por oxigénio. Contudo, o valor mais realista, descrito pela maioria dos autores é inferior a 20%, em virtude de, fruto dessa mesma reactividade, ocorrer, com facilidade, a contaminação da superfície, particularmente por hidrocarbonetos e carbonetos (77). É assim normal encontrar à superfície, para além dos esperados titânio e oxigénio, o carbono, em percentagens elevadas, resultando sempre de contaminação exterior, devido ao contacto do implante com o ar (25, 77, 198). No caso dos implantes maquinados, estas percentagens podem ainda ser maiores, devido ao contacto das superfícies com lubrificantes e óleos orgânicos, utilizados durante os procedimentos normais de produção e polimento (77). Os próprios procedimentos de limpeza e esterilização podem afectar a composição química da superfície, aumentando a percentagem de contaminantes, razão pela qual, a esterilização dos implantes deve ser feita com recurso a radiações (173, 229, 230). A deposição de elementos contaminantes, carbono ou outros, reduz a percentagem de titânio e oxigénio, disponível para o estabelecimento de ligações com os átomos e moléculas dos fluidos biológicos podendo, em certa medida condicionar ou mesmo comprometer a resposta biológica (197, 199). A importância da composição química da superfície é melhor percebida ao analisarmos as vantagens alcançadas, quando na presença de modificações químicas, como por exemplo, a colocação de revestimentos bioactivos (36, 99, 136, 191), do tipo fosfato de cálcio, como por exemplo a hidroxiapatite (37, 39, 94, 97, 120) ou uma sua variante, contendo flúor, a fluorapatite, que se revela particularmente favorável à resposta biológica, já que

promove, de forma mais marcada, a activação plaquetária (96) e favorece a diferenciação osteoblástica (11, 95, 131, 167, 241). Também a incorporação de diferentes iões, nomeadamente iões magnésio e cálcio nas superfícies, se revelam promotores do fenómeno da osteointegração, proporcionando uma integração mais rápida e mais forte, conforme observado em diversos estudos (30, 36, 99, 100, 102, 103). Trata-se, sem dúvida, de um campo a explorar, com forte potencial e que, provavelmente representa o futuro da implantologia.

Sul e colaboradores (30) analisaram diferentes implantes e concluíram que, de todas as características de superfície analisadas, a composição química revelou-se o parâmetro mais determinante na resposta óssea, desencadeando uma mais rápida e melhor osteointegração.

Apesar disso, a composição química da superfície ainda é pouco valorizada. A sua influência e importância têm sido analisadas essencialmente porque se verifica estar intimamente relacionada com a rugosidade. Sabe-se que, em função do tipo de tratamento de superfície utilizado para modificar a rugosidade, se podem induzir alterações na composição química dos implantes (34, 60, 77). Na realidade, os diferentes tratamentos de superfície, deixam habitualmente, vestígios de materiais estranhos, comportando-se um pouco como as impressões digitais, sendo esses resíduos, em parte, específicos de cada tipo de tratamento (88). São importantes porque podem, mesmo em pequenas quantidades, modificar as propriedades superficiais dos implantes ao ponto de condicionarem a resposta biológica por eles desencadeada. Ainda assim, o papel da composição química superficial, como característica isolada, não é totalmente compreendido.

A microtopografia, concretamente a rugosidade, e a composição química das superfícies estão assim directamente relacionadas já que modificando a primeira também se modifica a segunda, sendo esta última sempre um reflexo do tipo de tratamento e acabamento a que as superfícies foram submetidas (25, 77). Normalmente os implantes TPS e os submetidos a ataque ácido têm maior concentração de titânio e menor concentração de carbono (77, 88). Este aspecto está relacionado com a eliminação de carbono superficial devido às técnicas de acabamento que o eliminam no primeiro caso, por acção das elevadas temperaturas a que são bombardeadas as superfícies e, no segundo, através da dissolução das camadas periféricas por acção de ácidos (77). Estas técnicas revelam-se importantes porque ao eliminarem os contaminantes, aumentam a reactividade das superfícies, proporcionando implantes/materiais com maiores energias de superfície (90). Os implantes maquinados, uma vez que não são submetidos a nenhum tratamento final, apresentam habitualmente, pelo contrário, maiores concentrações de

carbono à superfície (77). Estas características podem assim interferir fortemente no processo da osteointegração.

Com base nestes aspectos, procuramos analisar a influência que seis superfícies diferentes poderiam induzir no comportamento de células osteoblásticas. Apesar de todos os implantes, por nós seleccionados, serem confeccionados em titânio comercialmente puro, apresentavam diferenças tanto ao nível da sua macroestrutura como da microestrutura. A nossa selecção baseou-se em quatro critérios:

1. inclusão de três superfícies grosseiramente diferentes, a saber, maquinados (grupos 1 e 2), jactada e submetida a ataque ácido, segundo diferentes protocolos, não revelados pelos fabricantes (grupos 3, 4 e 5) e revestidas a *spray* de plasma de titânio (grupo 6);

2. inclusão de implantes pertencentes ao mesmo tipo de superfície mas com macroestrutura diferente (grupos 1 e 2);

3. inclusão de implantes com a mesma macroestrutura e pertencentes ao mesmo tipo de superfície, embora submetidos a protocolos de tratamento diferentes, apresentando-se inclusivamente um implante, como uma evolução relativamente ao outro (grupos 4 e 5) e,

4. inclusão de implantes com uma macroestrutura semelhante mas com tratamentos de superfície distintos (grupos 1 e 3 e grupos 2 e 6, respectivamente).

Procuramos, com esta escolha, observar quatro aspectos distintos:

1. comparar a resposta biológica de três superfícies diferentes, independentemente da sua macroestrutura,

2. observar a possível interferência da macroestrutura na resposta osteoblástica,

3. observar a possível interferência da composição química na resposta biológica e finalmente,

4. observar a possível interferência de diferentes protocolos para a implementação de tratamentos de superfície, designados da mesma forma, na resposta biológica.

A avaliação da macro e microtopografica dos seis grupos de implantes foi realizada com recurso à Microscopia Electrónica de Varrimento. Apesar de se tratar de uma

avaliação qualitativa foi possível observar que as grandes diferenças se centravam ao nível micrométrico, e estavam relacionadas com o tipo de acabamento utilizado, para cada um dos grupos.

No que diz respeito à macrotopografia, a análise de implantes, do circuito comercial, com a forma mais comumente utilizada, isto é, implantes cónicos e/ou cilíndricos, com espiras, revelaram algumas diferenças nomeadamente quanto ao número de espiras, à distância entre elas e aos ângulos formados entre as suas vertentes, quer na zona do topo quer na zona dos fundos. Estas diferenças reflectem, naturalmente, as distintas abordagens dos fabricantes, em termos de engenharia dos implantes ao nível da sua superfície, local onde irão ocorrer as interacções com os sistemas biológicos. As diferenças observadas a este nível traduzem-se em diferenças, maiores ou menores, na estabilidade primária e, posteriormente, secundária, alcançada por cada um deles, traduzidas nos diferentes torques de remoção que os distintos tipos de implantes apresentam (55, 56, 189).

Quanto à microtopografia, as superfícies apresentaram diferenças qualitativas, mais ou menos evidentes, sendo possível, numa primeira fase, distinguir dois tipos principais de superfícies. Uma com um padrão de irregularidades com orientação perfeitamente definida e outras mais irregulares, apesar de não ser evidente uma direcção definida das irregularidades. As primeiras superfícies não foram sujeitas a qualquer tipo de tratamento, sendo superfícies maquinadas e apresentando as marcas do corte, com os sulcos correspondendo à orientação adoptada pela lâmina, durante a maquinação dos implantes e as segundas, superfícies que foram sujeitas a um tratamento final, após a maquinação, de harmonização e condicionamento. Às primeiras pertencem os implantes dos grupos 1 e 2, que apresentam uma superfície sulcada, com um padrão de sulcos evidente, paralelos entre si, e dispostos segundo uma direcção perfeitamente definida. Por vezes são visíveis defeitos na superfície, típicos destas superfícies, reflectindo falhas que podem ocorrer durante o processo de fabrico. Estas superfícies denominam-se anisotrópicas (85). Os restantes implantes não têm sulcos, apresentando igualmente superfícies irregulares, mas do tipo crateras e proeminências. Denominam-se isotrópicas (85). Dentro deste grupo de superfícies, onde se incluem superfícies submetidas a jactamento e ataque ácido e superfícies submetidas a bombardeamento com *spray* de plasma de titânio, observa-se maior diversidade. Mesmo no caso dos três grupos de implantes submetidos ao jactamento e ataque ácido, apesar de terem sofrido o mesmo tipo de tratamento, embora com protocolos distintos, apresentam microtopografias claramente distintas. Os implantes do grupo 4 apresentaram a superfície mais irregular com aspecto bastante diferente dos implantes pertencentes aos grupos 3 e 5. Estes dois grupos apresentaram superfícies formadas por crateras mais pequenas, de diâmetro variável mas mais regulares do que as observadas na superfície dos implantes do grupo 4.

A tipologia dessas irregularidades faz lembrar favos de mel. Comparando os grupos 3 e 5, as irregularidades dos segundos revelaram-se mais pequenas e mais homogêneas. Pelo contrário, a superfície dos implantes pertencentes ao grupo 4 apresentou-se com protuberâncias e crateras maiores, mais grosseiras e mais evidentes, lembrando aparas de chocolate. Apesar destes três tipos de implante terem sido submetidos a um tipo de tratamento com a mesma denominação, apresentaram diferenças qualitativas evidentes, ao nível da sua microtopografia. Os implantes do grupo 6 sobressaíram relativamente aos demais, apresentando uma superfície completamente diferente, com rugosidade extrema, pulverizada com partículas de *spray* de plasma de titânio, assemelhando-se a esferas esmagadas e deformadas resultantes do choque que sofreram ao serem projectadas contra a superfície, a altas temperaturas e a alta velocidade, endurecendo ao contactar com ela, por arrefecimento. É visível uma estrutura porosa, altamente irregular, parecendo apresentar várias camadas sobrepostas.

É assim notório, na análise qualitativa por Microscopia Electrónica de Varrimento, a divisão dos seis grupos de implantes em dois conjuntos distintos com padrões de irregularidades diferentes. O primeiro formado pelos implantes dos grupos 1 e 2 e um segundo formado pelos implantes dos grupos 3, 4, 5 e 6. O padrão de irregularidades e a sua disposição é importante porque as células e o seu crescimento são influenciados por estes dois aspectos. As células dispõem-se e crescem de acordo com a orientação das irregularidades (86, 87, 182).

Os implantes analisados foram agrupados em três classes, de acordo com o tipo de tratamento de superfície realizado para cada um deles. A análise dos implantes pertencentes a cada uma das classes permitiu verificar que, apesar de alguma variabilidade, a morfologia observada, para cada uma delas, formadas por implantes maquinados, submetidos a ataque ácido após jactamento e revestidos a *spray* de plasma de titânio, está dentro dos padrões considerados típicos, normais e esperados, para cada uma dessas superfícies (25, 31, 58, 60, 84, 202, 203, 234). Numa avaliação qualitativa, verificou-se que os implantes pertencentes à classe 2 apresentaram microtopografias com irregularidades intermédias em relação aos outros dois tipos de superfície. Foram assim observadas, no nosso trabalho, diferenças inter e intra-classes, relativamente à microtopografia dos implantes.

A análise da rugosidade dos seis grupos foi realizada com recurso a um profilómetro mecânico. Da revisão da literatura foi possível perceber que, podendo ser utilizados os dois tipos de avaliação (27, 52, 170, 171, 177, 202, 203), contactante, mecânica, e não contactante, óptica, há uma preferência por esta última, tal como referem Wennerberg e Albrektsson (54). Apesar de perceptível a preferência por este segundo método, na generalidade dos trabalhos, desde que, na década de noventa, estes dois autores

descreveram esta metodologia, pela primeira vez, aplicando-a à implantologia oral, ficou claro que também ela não é totalmente segura. Exige numerosas medições, em várias localizações, e está sempre dependente da escolha, subjectiva, de um filtro, por parte do investigador (54). Mesmo assim, a metodologia contactante também é utilizada na determinação da rugosidade, mesmo utilizando implantes com a forma cónica/cilíndrica, tal como são comercializados (202, 243), proporcionando resultados igualmente válidos. Esta análise comporta, no entanto, algumas limitações, devido ao tamanho e diâmetro da ponta do apalpador que faz o varrimento da superfície além de que, devido à necessidade de se estabelecer contacto directo com ela, pode danificar a estrutura a analisar. No nosso estudo, os implantes utilizados na caracterização da rugosidade, não foram reutilizados pelo que, este problema não se colocou.

Em ambas as metodologias, é necessário proceder ao maior número possível de medições e em diferentes localizações, sabendo-se que, mesmo assim, conforme já referido, não existe nenhum método que nos possa assegurar totalmente que os valores da rugosidade são verdadeiramente reais, mesmo quando se recorre a discos e não a implantes (54, 200). Wennerberg e Albrektsson (54) consideram necessário efectuar medições em, pelo menos, três implantes pertencentes a um mesmo lote.

No nosso trabalho, o principal motivo que nos levou a optar por efectuar as medições com recurso à profilometria mecânica foi o facto de, em Portugal, não existir nenhum modelo Topscan 3D de Microscopia Confocal de Varrimento Laser. Procurando que as nossas medições fossem o mais reais possíveis efectuamos, para cada grupo de implante, medições em vários implantes e em várias zonas. Devido às diferentes características de macroestrutura, específicas para cada grupo, não foi possível efectuar as medições nas mesmas localizações, para todos os grupos de implantes. Com base nos resultados obtidos procuramos fazer comparações inter-grupos bem como, intra-grupos, procurando igualmente, verificar da existência ou não de diferenças de rugosidade, dentro do mesmo implante.

Com base na metodologia mecânica, contactante, verificou-se que os valores foram diferentes entre os seis grupos analisados. Os implantes submetidos a tratamento de superfície apresentaram valores de rugosidade média mais elevados do que os maquinados. Por outro lado, também observamos que, sendo diferentes, de acordo com o tipo de tratamento de superfície, existe uma tendência para que os implantes apresentem valores de rugosidade média não sobreponíveis entre si, tendo por base os três tratamentos de superfície analisados. Também foi por nós verificado que, mesmo implantes com o mesmo tipo de tratamento, podem apresentar valores significativamente diferentes. Os valores de rugosidade média obtidos para cada um dos grupos estão em sintonia com o observado, para esses mesmos implantes, através da

análise qualitativa da sua microtopografia, com recurso à Microscopia Electrónica de Varrimento.

Os valores mais baixos foram obtidos para os implantes maquinados, com valores inferiores a $0,5 \mu\text{m}$. Devido ao facto de apresentarem, normalmente, valores baixos, estas superfícies são também, muitas vezes, classificadas como lisas. O valor encontrado no grupo 1 foi ligeiramente inferior ao do grupo 2, embora a diferença não se tenha revelado significativa. Para além de apresentarem um valor de rugosidade média, ligeiramente superior, os implantes do grupo 2 também apresentaram valores topo-fundo maiores, em média, demonstrando um perfil de irregularidades, um pouco mais acentuado. Os implantes jacteados e submetidos a ataque ácido apresentaram valores de rugosidade média (R_a) mais elevados do que os observados para os implantes maquinados, apresentando essas diferenças significado estatístico. Os valores obtidos, para os três grupos de implantes com este tipo de tratamento, foram inferiores a $1,5 \mu\text{m}$ e superiores a $0,5 \mu\text{m}$, o que torna estas superfícies minimamente ou moderadamente rugosas, segundo a classificação de Wennerberg e Albrektsson (60). Os valores encontrados para esta classe de implantes não foram iguais, entre si, tendo-se a diferença de rugosidade revelado significativa entre os implantes do grupo 5 e os implantes dos grupos 3 e 4. Estes dois últimos grupos apresentaram valores sobreponíveis entre si, com diferenças muito pequenas, sem significado estatístico. O grupo 6, formado pelos implantes com superfície TPS, foi o grupo que apresentou os valores de rugosidade média, mais elevados, superiores a $2,0 \mu\text{m}$, o que torna estas superfícies muito rugosas com valores médios, topo-fundo, muito acentuados. A diferença da rugosidade média dos implantes do grupo 6, relativamente a todos os outros grupos, é acentuadamente maior do que a observada entre os restantes grupos, tendo essa diferença significado estatístico. Há assim uma clara ordenação, crescente, da rugosidade média dos grupos, em maquinados, jacteados/ataque ácido e TPS.

Os valores encontrados para os seis grupos em análise, de acordo com o tipo de tratamento de superfície, estão em sintonia com o observado noutros estudos principalmente no que diz respeito à ordenação das rugosidades, referida anteriormente (27, 35, 52, 170, 180, 202, 203).

Conforme já referido, para além da determinação de eventuais diferenças nos valores de rugosidade média, inter-grupos, procuramos igualmente verificar a existência de diferenças intra-grupos, isto é, procuramos verificar se, na realidade existiam diferenças, considerando as várias localizações passíveis de serem medidas, dentro de um mesmo implante. Para isso foram considerados apenas os grupos 2 e 6, únicos grupos onde foi possível fazer leituras da rugosidade em quatro localizações distintas, devido às suas características macroestruturais. Recorde-se, como já foi referido no capítulo III,

capítulo dos materiais e métodos, que os implantes 2 e 6 tinham a mesma macroestrutura mas microestruturas diferentes. Estes dois grupos apresentavam ainda a particularidade de representarem dois tipos de superfície distinta, uma superfície anisotrópica e outra isotrópica, respectivamente para o grupo 2 e 6. Foram observadas diferenças, com significado estatístico, no caso do grupo 2, para algumas das localizações consideradas, concretamente nos valores obtidos para o fundo da espira, chanfro e chanfro transversal, quando comparados entre si, não se tendo observado diferenças com significado estatístico apenas nas comparações efectuadas entre os valores obtidos ao nível do chanfro e do chanfro transversal. Nas medições efectuadas nas mesmas localizações dos implantes do grupo 6, pelo contrário, não foram observadas diferenças com significado estatístico. Foi assim evidente que a rugosidade média pode não ser igual nas diferentes zonas de um mesmo implante, tendo essas diferenças sido menos marcadas nos implantes do grupo 6, isto é, em implantes submetidos a tratamento de superfície. As diferenças observadas para o grupo 2 provavelmente estarão relacionadas com o facto deste tipo de superfície apresentar uma orientação das irregularidades bem definidas, fruto da forma como são maquinados, o que pode influenciar as leituras de rugosidade (54). No caso dos implantes submetidos a um tratamento de superfície, esse tratamento pode eventualmente, acabar por criar uma certa harmonia da superfície, homogeneizando-a. Desta forma, é possível esbater potenciais diferenças existentes ao nível da superfície. A não existência de diferenças na rugosidade média medida nos implantes do grupo 6 deve, no entanto, ser analisada com alguma prudência, pelo facto de, com esta metodologia, não ser possível determinar a rugosidade nos topos e nas vertentes, local onde poderiam ser notadas eventuais diferenças, tal como é referido por Wennerberg e Albrektsson (54), conforme já foi comentado.

Apesar dos valores de rugosidade não serem específicos de cada tipo de tratamento de superfície é possível definir limites de variação, em função do tratamento, não sendo previsível a sobreposição de valores médios de rugosidade para superfícies submetidas a diferentes tratamentos de superfície.

A análise da composição química dos seis grupos de implantes permitiu observar alguns aspectos interessantes. Tal como acontece com outros estudos (77, 198, 228, 230), os elementos mais frequentemente observados, à superfície, são o titânio, o oxigénio e o carbono. A presença do oxigénio, em percentagens elevadas, está relacionada com a grande reactividade natural que o titânio, material com que são confeccionados todos os implantes analisados, apresenta formando, quando entra em contacto com o ar ou com fluidos orgânicos, uma camada de óxido de titânio (24, 92). O oxigénio surge assim associado ao titânio, à superfície, formando uma camada protectora e, ao mesmo tempo, de elevada biocompatibilidade (24, 26, 75, 124). O carbono, principalmente quando em percentagens elevadas, é o resultado de contaminação externa ou do contacto com as

máquinas e componentes orgânicos, tais como óleos lubrificantes e solventes orgânicos, durante o seu processo de fabrico. No nosso estudo, com excepção dos implantes do grupo 6, todos os implantes apresentaram valores elevados para este elemento. Os valores médios encontrados foram semelhantes na classe 1, formada por implantes maquinados, e na classe 2, formada por implantes submetidos a jactamento e ataque ácido, pertencendo o valor mais elevado aos implantes do grupo 5. Os valores médios mais baixos, em contrapartida, foram encontrados nos implantes do grupo 6, implantes revestidos a *spray* de plasma de titânio, o que está de acordo com o que é referido por outros autores (77, 198). Neste estudo não foi contudo, observado aquilo que é comumente aceite, noutros estudos, isto é, que os implantes maquinados apresentam valores de carbono mais elevados do que as demais superfícies (77).

Os valores elevados de carbono, encontrados para as classes 1 e 2, e a não existência de diferenças significativas entre estas duas classes, estão provavelmente relacionados com a contaminação causada pelo manuseamento dos implantes, antes da sua análise química. Também pode ter ficado a dever-se ao facto de os implantes terem sido esterilizados, em autoclave, previamente à sua análise. Conforme referem Vezeau e colaboradores (197), a esterilização dos implantes pode conduzir à contaminação dos implantes, com aumento dos níveis do elemento carbono, e modificação da composição química superficial, sendo contra-indicada. Estes autores concluíram que a esterilização de implantes pelo óxido de etileno e por vapor húmido, em autoclave, eram capazes de produzir contaminação e modificações na superfície dos implantes, susceptíveis de afectarem a sua biocompatibilidade e a resposta biológica. Também Stanford e colaboradores (199) verificaram que a expressão génica das células osteoblásticas foi afectada pelo processo de esterilização realizado. No seu estudo, os implantes foram submetidos a esterilização por radiação ultra-violeta, gás de óxido de etileno, autoclave e plasma de árgon tendo os melhores resultados sido obtidos por este último processo. A presença de contaminantes à superfície e a consequente diminuição da energia de superfície foi considerada a razão para a obtenção de piores resultados pelos restantes métodos. Este aspecto é importante e vem reforçar a necessidade de correctos procedimentos de limpeza e esterilização, preconizados pelos fabricantes e a não limpeza e esterilização, em autoclave, sob nenhum pretexto, dos implantes dentários em ambiente de consultório. Este não é o método utilizado pelos fabricantes que recorrem à esterilização por radiações (197, 199, 229). A nossa opção em esterilizar todos os implantes, apesar de virem esterilizados de fábrica, ficou a dever-se ao interesse em criar as mesmas condições nos implantes a utilizar nas diferentes fases do trabalho, quer na fase de análise topográfica quer na fase de análise do comportamento biológico. Os implantes da classe 3, apesar de terem sido manuseados ao mesmo tempo e da mesma forma e terem igualmente sido submetidos a esterilização, em autoclave, apresentaram valores menores, dentro dos valores esperados para este tipo de implantes (77). Tal pode

ficar a dever-se ao facto de esta classe ser formada por um número menor de amostras, comparativamente com as outras duas classes, ou ainda, ao facto de neste tipo de superfície, os valores habitualmente encontrados serem muito inferiores aos observados para outras superfícies.

As elevadas percentagens de carbono observadas, tendo em conta que resultam essencialmente de contaminação externa, permitem-nos perceber a importância de um bom manuseamento dos implantes durante os procedimentos cirúrgicos, de modo a evitar o aumento da concentração deste elemento que poderia interferir negativamente com a resposta biológica. É assim importante que as embalagens, contendo os implantes, só sejam abertas no preciso momento em que, já com o leito implantar preparado, se procede à sua introdução, havendo o mínimo contacto com o ar. Nunca é demais lembrar a elevada reactividade do titânio, quando na presença do ar. No nosso estudo, as amostras foram manuseadas com cuidado, tendo sido abertas só no momento da realização das análises. Contudo, o facto de terem sido manuseadas por pessoal não médico, provavelmente menos sensibilizado e menos conhecedor desta realidade, e o facto de o seu acondicionamento no microscópio, para posterior análise, obrigar a um contacto directo com a estrutura, pode justificar, pelo menos em parte, os valores elevados observados particularmente nos implantes dos grupos 1, 2, 3, 4 e 5. Para além do manuseamento, também pode ter contribuído para os valores elevados deste elemento, o facto de os implantes terem sido esterilizados com recurso a um autoclave que, conforme é referido por Vezeau e colaboradores (197) pode modificar a composição química da superfície dos implantes.

Apesar de, como é referido, o valor máximo esperado de titânio, à superfície, ser de 33%, devido à formação da camada de óxidos e de o máximo real esperado ser inferior a 20%, conforme é aceite (77), no nosso estudo, esse valor só foi aproximado para os implantes TPS pertencentes ao implantes do grupo 6, classe 3. Em todos os outros grupos, o valor observado ficou bastante abaixo, com valores variando entre os 6 e os 13%. Esses valores, mais baixos, poderão estar relacionados com as percentagens elevadas de carbono, observadas nas nossas amostras. O aumento da percentagem de carbono reduz necessariamente a correspondente percentagem de titânio, com possíveis implicações na resposta osteoblástica, uma vez que o titânio fica mascarado, não estando disponível para estabelecer ligações com os componentes biológicos. No nosso estudo, a percentagem de carbono variou entre os 19 e os 69% e a de titânio entre os 7 e os 22%. Os valores mais altos de titânio, como seria de esperar, foram observados para os implantes TPS. Nas outras duas classes, classes 1 e 2, não foram observadas diferenças significativas entre os elementos carbono, titânio e oxigénio.

Para além destes três elementos químicos, foram observados outros, em muito menores concentrações, por vezes residuais, tais como o azoto, o flúor, o alumínio, o silício, o fósforo e o cálcio, estando de acordo com o observado por outros autores, noutros trabalhos (77, 88, 198, 228, 231). A presença de outros elementos, com valores muito baixos, por vezes mesmo sem significado, é justificada, na maior parte das vezes, com os diferentes procedimentos realizados no decurso da produção dos implantes. Nas amostras deste estudo, as percentagens são pouco significativas, tendo pouco ou nenhum interesse clínico.

A análise XPS, sendo uma boa técnica utilizada na caracterização química da camada mais superficial dos implantes, não permite contudo, estabelecer conclusões quanto à origem dos elementos químicos encontrados. Segundo alguns autores (77, 92, 93, 198, 228) a presença destes elementos pode, em certa medida, ser justificada pelos diferentes passos ocorridos, ao longo do processo de fabrico dos implantes, que incluem a confecção, o tratamento da superfície, a manipulação, a sua limpeza e desinfecção/esterilização, desde que a sua presença não seja intencional, visando a melhoria da resposta biológica. Assim, a presença de cálcio, particularmente nos implantes maquinados e nos implantes TPS, pode ficar a dever-se ao facto de serem mergulhados em água, aquando da sua lavagem, durante o processo normal de fabrico. A lavagem com álcool e água desionizada faz aumentar a concentração em carbono, embora a sua presença também esteja relacionada, conforme já foi referido, pelo contacto com o ar. No caso dos maquinados também se pode ficar a dever ao contacto com óleos lubrificantes e solventes orgânicos, utilizados durante o seu corte. O azoto e o flúor podem resultar do contacto com diferentes ácidos, durante a preparação das superfícies. No caso dos implantes TPS, a incorporação do azoto também pode estar relacionada com a ligação deste elemento às partículas de titânio, formando nitretos de titânio, durante a execução do processo de formação do *spray* de plasma e do seu bombardeamento sobre a superfície. A presença do silício, particularmente no caso dos implantes maquinados, pode estar relacionada com o contacto com produtos, à base de carboneto de silício, muito utilizados no polimento final das peças (77). Para além destes elementos é de destacar a presença de duas fases de chumbo, Pb 4f (4f5 + 4f7), nos implantes maquinados, dos grupos 1 e 2. Apesar de não desejável, está igualmente de acordo com o relatado por outros autores (93) para este tipo de superfícies, representando contaminação exterior causada pelo contacto com as máquinas, durante o processo de fabrico dos implantes. Apesar de se tratar de quantidades desprezíveis, tal não deve ser negligenciado, uma vez que se trata de um elemento tóxico. A presença deste elemento, particularmente em implantes maquinados, é reportada igualmente noutros estudos (93).

Neste trabalho foram analisados implantes formados por titânio comercialmente puro pelo que, recorrendo à análise EDS, que consegue alcançar profundidades um pouco maiores do que as alcançadas pela técnica XPS, observou-se uma composição química mais aproximada, mais semelhante, para os seis grupos de implantes. Como seria de esperar são formados maioritariamente por titânio e, em menor escala, por outros elementos, nomeadamente o carbono, o oxigénio, o silício e o alumínio. A presença destes dois últimos elementos está relacionada provavelmente, com o jacteamto das superfícies com partículas de óxido de silício e óxido de alumínio, que conseguem penetrar alguns micrómetros. No caso da utilização de óxido de alumínio a incorporação de partículas de alumínio pode acarretar algum risco, tal como é referido por alguns autores (17, 123), pelo menos em termos teóricos de, por dissolução das camadas superficiais, poder ocorrer a libertação destes iões para os tecidos adjacentes. Este fenómeno pode levar a um comprometimento da biocompatibilidade, podendo conduzir à inibição da normal mineralização do tecido ósseo (212). As baixas quantidades observadas e a protecção que a camada de óxidos confere aos implantes, limitam essa possibilidade (17, 24, 75, 107). A utilização de partículas de óxido de titânio, em alternativa, pode apresentar vantagens, uma vez que não se incorporam elementos estranhos (112).

No nosso estudo só foi possível estabelecer diferenças com significado estatístico, entre as classes 1 e 3 e as classes 2 e 3. Neste último caso, com excepção do elemento chumbo. Não foi possível estabelecer diferenças claras e com significado estatístico entre as classes 1 e 2, isto é, entre os implantes maquinados e os submetidos a jacteamto e ataque ácido, com excepção do elemento chumbo que não foi encontrado em nenhum implante pertencente à classe 2. Este facto sugere que, para os implantes analisados, a contaminação, mas não a topografia de superfície, constitui a variável dominante na influência da composição química da superfície.

Da análise da rugosidade e da microtopografia parece evidente que não é suficiente classificar um implante apenas com base na identificação do tipo de tratamento a que foi submetido uma vez que, implantes submetidos a tratamentos de superfície semelhantes, sob o ponto de vista de designação, podem apresentar características distintas quanto à sua microestrutura e rugosidade, conforme ficou claro da comparação dos implantes pertencentes aos grupos 3, 4 e 5. Sendo os fenómenos que ocorrem durante a osteointegração dependentes e influenciados por estas características (60, 105, 169, 173, 177, 181, 186, 187), percebe-se porque é que implantes sujeitos ao mesmo tipo de acabamento, podem apresentar resultados *in vitro*, *in vivo* ou clínicos, tão diferentes (28, 33, 37, 40, 48, 55, 56, 63, 94, 104, 158, 176).

Parece assim ser importante caracterizar os implantes quanto à sua rugosidade, microtopografia e composição química de superfície com vista a melhor interpretar a resposta biológica e a compreender eventuais fracassos.

Conforme já foi referido, a resposta dos sistemas biológicos à colocação de implantes, passa por várias etapas, inicialmente a nível atómico e molecular, com a formação de uma camada de biomoléculas que recobre a superfície do implante e, em seguida, a nível celular com a fixação das células à superfície do implante, fixação essa conseguida entre sequências específicas de aminoácidos presentes nas proteínas que se depositam à superfície do implante e receptores localizados na superfície das células, denominados integrinas (53, 61, 105, 192). Esta primeira fase celular, a adesão, é avaliada *in vitro*, nas primeiras horas após a cultura. Neste estudo todos os implantes demonstraram proporcionar uma adesão celular semelhante observando-se células em todas as seis superfícies analisadas. Esta fase é crucial e tem a particularidade de, *in vitro*, ser extremamente sensível já que depende de um único momento de sementeira, contrariamente ao que sucede *in vivo*, em que as células vão sendo constantemente transportadas até ao local da implantação (53, 210, 237). Em relação a esta etapa da experimentação *in vitro*, não é evidente a influência que as diferentes microtopografias, rugosidades e composição química possam desenvolver, contrariamente ao que sucede *in vivo*, em que essa influência parece ser certa (172, 198). *In vitro*, contrariamente ao que sucede *in vivo*, as células são semeadas através de um meio de cultura que é depositado sobre o implante, com forma cónica ou cilíndrica ou de um disco, pelo que as células soltas têm de encontrar as condições de estabilidade suficientes para iniciarem o processo de adesão ao substracto. *In vivo*, o contacto ósseo é muito próximo, já que a cirurgia implantológica, é uma cirurgia altamente precisa, realizada com brocas calibradas, capazes de garantir que a distância superfície-implante seja pequena. É assim fundamental proporcionar e garantir excelentes condições de cultura de modo a permitir a adesão celular. Nesta fase, parece revelar-se mais determinante a macroestrutura dos implantes, o afastamento entre espiras e a existência de superfícies planas, por exemplo no fundo das espiras, do que propriamente a microtopografia. Aos 7 dias de estudo, já foi evidente, mediante técnicas de coloração específicas, a organização do citoesqueleto. Nesta fase já se começa a sentir a influência do tipo de superfície, nomeadamente da sua rugosidade, sobre o fenotipo celular. Células mais diferenciadas apresentam-se com aspecto mais cuboidal, com prolongamentos citoplasmáticos, estabelecendo pontes inter-celulares e entre irregularidades nomeadamente, entre topos, caso a distância assim o permita. Superfícies mais favoráveis induzem maior diferenciação e maior complexidade organizacional, com trama colagénica evidente e vários níveis celulares. A Microscopia Confocal de Varrimento Laser aliada à coloração F-actina permitiu avaliar a organização do citoesqueleto das células, neste estudo. Aos 7 dias, já era evidente o início da diferenciação celular, com as células a abandonarem a forma globosa e a tornarem-se

mais alongadas e achatadas para posteriormente, se tornarem cuboidais e começarem a desenvolver os prolongamentos. Aos 21 dias essa organização tornou-se mais evidente com todos os grupos a mostrarem fenotipos próprios de células diferenciadas. Em termos de conjunto, a observação do padrão de crescimento celular mostrou, entre os dias 7 e 28, diferenças significativas, para os diferentes grupos analisados. De uma forma geral, todos eles proporcionaram o crescimento celular, com as superfícies praticamente todas recobertas por células, aos 28 dias de cultura, contudo com padrões de crescimento diferentes. Nas superfícies maquinadas foi evidente que as células se apresentaram menos diferenciadas, surgindo alongadas, achatadas, plenamente espalhadas e dispostas em paliçada, com aspecto e um fenotipo do tipo fibroblástico. Verificou-se também que apresentaram alguma preferência em termos de orientação do crescimento, notando-se um crescimento diferente entre as duas vertentes visíveis. Num lado, dispendo-se paralelamente às irregularidades e no outro, perpendicularmente. Nas superfícies tratadas, com um padrão de irregularidades mais homogêneo, o padrão de crescimento apresentou-se mais complexo com uma organização de conjunto mais elaborada embora sendo possível observar diferenças entre as várias superfícies analisadas. Os implantes do grupo 3 apresentaram o padrão de crescimento mais complexo com uma trama de colagénio bem definida, com células apresentando um padrão de diferenciação elevado, com numerosos prolongamentos e dispostas em várias camadas, sendo nítida a presença de inúmeras pontes entre os diferentes níveis celulares. Nos implantes do grupo 5 é evidente que, aos 28 dias, o crescimento celular foi tão acentuado que conduziu ao descolamento das camadas celulares sendo também evidentes numerosas fibras de colagénio. O padrão de crescimento dos implantes do grupo 4 revelou-se semelhante ao dos implantes maquinados, apesar de se tratar de um implante sujeito a um tipo de tratamento de superfície do tipo do aplicado aos implantes dos grupos 3 e 5. No caso dos implantes TPS o crescimento celular foi igualmente bastante evidente, embora a superfície, aos 28 dias de cultura, ainda não estivesse totalmente preenchida por células. Foi assim, perceptível um padrão de crescimento menos complexo para os implantes dos grupos 4 e 6, do que o observado para os implantes dos grupos 3 e 5.

A observação do crescimento celular permitiu-nos constatar os seguintes factos. O padrão de crescimento observado nos implantes dos grupos 1 e 2, maquinados com diferente macroestrutura, foi semelhante, entre si, com células a recobrir as superfícies e apresentando um crescimento orientado e com células dispostas em paliçada. O grau de diferenciação foi menor do que o observado para as superfícies tratadas. A comparação do padrão de crescimento celular observado à superfície dos implantes dos grupos 4 e 5, levou-nos a verificar que foi maior e mais complexo nos implantes do grupo 5 com as células a destacarem-se da superfície, devido ao crescimento excessivo, apresentando uma complexidade grande com uma trama de fibras de colagénio bem definida. Os

implantes do grupo 5 tratavam-se, de acordo com o fabricante, de uma evolução dos implantes do grupo 4, o que foi visível e confirmado através da observação, com recurso a imagens de Microscopia Electrónica de Varrimento, do padrão de crescimento celular, para cada um dos casos. O padrão de crescimento dos implantes do grupo 1, maquinados, e os do grupo 3, submetidos a jacteamto e ataque ácido, mas apresentando macroestrutura semelhante entre si, foi diferente, observando-se no segundo caso, um grau de complexidade mais elevado, tendo-se mesmo revelado o padrão de crescimento mais complexo de todos os seis observados. O mesmo se verificou entre os grupos 2 e 6, com este último grupo a apresentar um melhor padrão de crescimento.

Neste trabalho foi evidente que as diferentes superfícies implantares proporcionam condições para o crescimento celular embora, tenha sido claro que o fazem com graus e complexidades distintos. Em alguns casos, concretamente nos grupos 3 e 5, foi visível uma grande densidade de contactos focais com a superfície e com outras células, mostrando uma melhor organização do citoesqueleto com fibras de actina mais notórias. Esta organização está dependente das características da superfície dos implantes, nomeadamente da distância dos topos e fundos (86, 182). Ficou igualmente claro, com recurso à análise qualitativa do padrão de crescimento celular que as superfícies celulares, através da sua macro e microestrutura, podem influenciar o crescimento celular, já que foi possível comparar crescimentos observados em implantes com o mesmo tipo de superfície mas com macroestrutura diferente (grupos 1 e 2), implantes com a mesma macroestrutura mas com diferentes microestruturas, apesar de terem o mesmo tipo de tratamento de superfície (grupos 4 e 5) e ainda, implantes com a mesma macroestrutura mas com tratamentos de superfície distintos (grupos 1 e 3 e grupos 2 e 6), observando diferenças entre cada um deles.

Estas observações estão de acordo com o relatado por outros autores. Schneider e colaboradores (220) verificaram uma nítida diferença na orientação dos osteoblastos nas superfícies maquinadas e nas jacteadas, reflectindo provavelmente, que a expressão fenotípica destas células é dependente da microtopografia de superfície. As diferenças na expressão fenotípica das células traduzem-se em diferenças ao nível da sua forma, da organização do seu citoesqueleto e da sua diferenciação.

Uma vez terminado o processo de adesão celular, processo muito sensível, particularmente na experimentação *in vitro*, as células começam a proliferar e a diferenciarem-se em osteoblastos, quando sujeitas aos estímulos apropriados. Nesta fase é importante que se verifiquem determinadas condições para que este processo de diferenciação seja bem sucedido, no sentido da linhagem osteoblástica. Na experimentação *in vivo* desempenham, papel fundamental, o aporte sanguíneo, a tensão

em oxigénio do local implantado e a ausência de micromovimentos durante a fase de cicatrização (215, 217). Na experimentação *in vitro*, a utilização do ácido ascórbico, do β -glicerofosfato e da dexametasona fornecem o estímulo apropriado de modo a garantir essa diferenciação (232). Criam-se, deste modo, as condições para se começarem a produzir proteínas osteogénicas que irão formar a matriz extracelular, numa primeira fase não mineralizada, denominada osteóide e, numa segunda fase, por maturação, mineralizada. Durante esta última fase, é fundamental a presença de cálcio e fósforo, de modo a garantir os elementos necessários à calcificação. Esses elementos são consumidos na formação dos depósitos de fosfato de cálcio observáveis na matriz extracelular. Este fenómeno reflecte o processo da mineralização, sendo também visível *in vitro*.

Para que se produzam as proteínas osteogénicas necessárias à maturação da matriz extra-celular, é necessária a expressão dos correspondentes genes. Essa expressão ocorre quer *in vivo* quer *in vitro*. São estes genes que irão posteriormente regular a síntese das correspondentes proteínas que desempenharão o papel chave no processo de osteogénese. A expressão do mRNA ocorre em diferentes fases da osteogénese (132), sendo regulada pelo factor Cbfa1 (*core-binding factor α*), também denominado RUNX-2 (218) e pelo factor Ostérix (221). O aumento da expressão do mRNA do colagénio tipo I ocorre no período inicial da proliferação e da síntese da matriz extracelular. A do gene da fosfatase alcalina ocorre, principalmente, numa fase pós-proliferação, durante a maturação da matriz. A dos genes da osteocalcina, osteopontina e BMP-2 ocorrem numa fase mais tardia, durante a mineralização da matriz. Essa expressão génica é influenciada pela topografia de superfície provavelmente como consequência de modificações ocorridas na configuração das células e, mais uma vez, mediadas pelas integrinas (19, 79, 164, 167, 216, 219).

Neste trabalho foi analisada a expressão génica de quatro genes reguladores da osteogénese correspondentes ao colagénio tipo I, à fosfatase alcalina, à osteoprotegerina e à BMP-2, em função das seis superfícies analisadas. Procurou-se estudar os genes de proteínas osteogénicas que surgem em diferentes fases da osteogénese, uns numa fase mais inicial e outros numa fase mais tardia. Não foram observadas diferenças notórias, com significado estatístico, nem uma evidência de maior expressão para superfícies tratadas relativamente às superfícies maquinadas, ao 21º dia da cultura, fase em que as células já se encontravam bastante diferenciadas em todas as superfícies. Estes resultados não são surpreendentes e estão de acordo com o obtido por outros autores que verificaram haver um aumento na expressão de diferentes genes associados à osteogénese não tendo, igualmente, encontrado diferenças significativas entre superfícies maquinadas e superfícies tratadas (130, 216, 219). A explicação para a não observação de diferenças na expressão destes genes, entre as diferentes superfícies analisadas, pode ficar a dever-se, por um lado, ao facto de todas as superfícies terem

demonstrado proporcionar, desde que mantidas boas condições, a osteointegração e, por outro lado, porque os níveis de mRNA foram medidos num só tempo de cultura, concretamente aos 21 dias, numa fase em que as células já se apresentavam suficientemente diferenciadas, em todas as superfícies analisadas. Talvez se se tivesse analisado essa expressão em dois tempos distintos, um mais precoce e outro mais tardio, se tivessem encontrado diferenças. Contudo, não é fácil definir um dia de cultura onde fosse previsível ocorrerem tais diferenças. O facto de não se terem observado diferenças, confirma que todas as superfícies são susceptíveis de induzir a formação óssea e a consequente osteointegração, *in vivo*. Uma vez que a osteogénese necessita da produção de proteínas osteogénicas e, para que isso ocorra, é necessário que ocorra a expressão do mRNA correspondente aos genes osteogénicos que controlam a formação dessas proteínas, é compreensível a não observação de diferenças entre os seis tipos de implantes.

Masaki e colaboradores (219) observaram a influência da topografia de superfície na expressão génica de factores de transcrição reguladores da osteogénese. O aumento dessa expressão não foi no entanto linear já que nem todas as superfícies apresentaram o mesmo aumento nessa expressão, em relação às superfícies controlo, de plástico, logo lisas. Não foram mesmo observadas diferenças com significado estatístico na expressão dos genes correspondentes à osteocalcina e à sialoproteína óssea 2. Neste trabalho só foram estudadas superfícies com tratamento e o plástico que funcionou como controlo, não tendo sido utilizadas superfícies maquinadas.

Schneider e colaboradores (216) também verificaram uma maior expressão dos genes *Cbfa1* e da osteocalcina em superfícies sulcadas, tipo maquinada, e em superfícies rugosas, submetidas a jacteamto, comparativamente com superfícies de plástico, consideradas lisas. Neste estudo a expressão do gene *Cbfa1* e da osteocalcina foi maior nas superfícies maquinadas, quando comparada com a obtida pelas superfícies rugosas. Também compararam superfícies sulcadas, tipo maquinada, e superfícies jacteadas, tendo verificado diferenças na expressão dos genes *Cbfa1* e da sialoproteína óssea 2. Num outro trabalho, estes mesmos autores (220) compararam a expressão destes dois genes, nestas mesmas duas superfícies, utilizando dois tipos distintos de culturas celulares; osteoblastos UMR-BSP e osteoblastos de calvária de feto de rato. Os dois genes apresentaram valores de expressão mais elevados, com significado estatístico, para as superfícies rugosas comparativamente com os valores obtidos para as superfícies maquinadas. Já no que diz respeito à expressão génica obtida para estas duas superfícies, considerando apenas culturas de células de calvária de feto de rato, os valores foram diferentes. Para o gene *Cbfa1* foram observados valores mais elevados nas superfícies jacteadas, enquanto que, para o gene da sialoproteína 2 foram encontrados valores mais elevados nas superfícies maquinadas. Os autores concluíram que a microtopografia de

superfície influencia a expressão de genes reguladores da osteogénese, independentemente de se tratarem de superfícies sulcadas ou jacteadas, e também foi evidente a influência, nos estudos *in vitro*, do tipo de culturas celulares utilizados.

Isa e colaboradores (167) analisaram a influência de três tipos de superfície, com diferentes graus de rugosidade, na expressão de vários genes reguladores da osteogénese. Todas as superfícies analisadas eram rugosas, não sendo nenhuma delas lisa ou maquinada. Só foram evidentes diferenças estatisticamente significativas, entre as superfícies, para o gene *Cbfa1*.

Como se percebe do estudo de Schneider e colaboradores (220) os resultados, muitas vezes, não podem, ou pelo menos não deveriam, ser directamente comparáveis porque as culturas celulares utilizadas são diferentes. No presente estudo, foram utilizadas células de origem humana, procurando que as condições criadas fossem o mais próximo da realidade clínica. Por outro lado, tanto quanto é do nosso conhecimento, e com base nos trabalhos analisados, com excepção da investigação de Isa e colaboradores (167), raramente é feita qualquer referência concreta, quantitativa, à rugosidade das superfícies. É apenas referido se se tratam de superfícies rugosas, sulcadas ou lisas mas nunca é referido o R_a ou o S_a da superfície em estudo. Torna-se assim difícil comparar resultados sem uma referência clara aos valores de rugosidade já que, uma superfície dita lisa, num trabalho, pode ser considerada moderadamente rugosa, noutra (60). É, assim, importante caracterizar sob o ponto de vista topográfico e químico, as superfícies em análise, de modo a poder avaliar com mais rigor, os resultados e perceber se são ou não comparáveis. É também evidente que a expressão genica, sem diferenças evidentes entre as várias superfícies, mostra que todos os três tipos de superfície, formando as três classes definidas, constituídas por implantes formados a partir de titânio comercialmente puro, têm potencial para sintetizar proteínas ósseas, logo para osteointegrarem. Neste trabalho procuramos ver se alguma das superfícies apresentava um comportamento francamente pior ao não expressar ou ao fazê-lo de forma menos intensa, para algum dos genes analisados. Tal objectivo não foi conseguido.

As diferenças mais evidentes entre as superfícies analisadas verificaram-se ao nível da quantificação da actividade da fosfatase alcalina e da quantidade de cálcio ionizado consumido a partir do meio. Dois importantes quantificadores da osteogénese. Analisando a actividade da fosfatase alcalina, enzima fundamental para a formação óssea, e considerado um marcador da diferenciação osteoblástica, verificou-se que os níveis começaram por ser baixos nos primeiros dias, não tendo expressão nos primeiros 7 dias. A partir deste momento, e durante a segunda semana de cultura, esses níveis começaram a aumentar para todos os grupos de implantes, sugerindo que as células estavam a sofrer o processo normal de diferenciação celular. O aumento da actividade desta enzima

ocorreu, no entanto, mais precocemente para os implantes pertencentes aos grupos 3, 5 e 6. O pico da actividade para estes três grupos de implantes verificou-se ao 21º dia de cultura, alguns dias antes do observado para os implantes constituindo os grupos 1, 2 e 4, cujo pico máximo foi alcançado quatro dias depois, ao 25º dia de cultura. Desempenhando esta enzima um papel crucial no início da mineralização da matriz, proporcionando o fósforo ionizado, necessário ao processo, observou-se que os grupos 3, 5 e 6 iniciaram, um pouco antes, este processo. Após se ter atingido esta fase, e com a mineralização iniciada, a sua expressão diminuiu. A mineralização, um fenómeno específico das células da linhagem osteoblástica, ocorre a partir da terceira semana de cultura, tendo sido observadas algumas diferenças entre os vários grupos de implantes, como foi confirmado pela determinação dos níveis de Ca_i quantificados a partir do meio de cultura. A quantificação da actividade da fosfatase alcalina permite fazer algumas comparações e, em certa medida, observar a influência da microtopografia da superfície dos implantes. As superfícies maquinadas apresentaram uma tendência para iniciarem a mineralização da matriz um pouco mais tarde do que as superfícies tratadas, com excepção dos implantes do grupo 4, que revelaram um comportamento, em grande parte, semelhante ao observado para os implantes maquinados. O pico da actividade da fosfatase alcalina foi atingido mais cedo para os implantes do grupo 5 comparativamente com os implantes do grupo 4 que têm a mesma macroestrutura e o mesmo tratamento de superfície, embora com protocolos diferentes, confirmando-se, na análise deste parâmetro, tratar-se de uma evolução relativamente aos implantes pertencentes ao grupo 4. Estas diferenças observadas entre estes dois grupos de implantes, comprovam a influência que o tratamento de superfície pode desempenhar, na resposta biológica, já que, apesar de submetidos ao mesmo tipo de tratamento, apresentavam microtopografias diferentes. A influência da microtopografia é igualmente, confirmada pelo facto de os implantes pertencentes aos grupos 1 e 3, que também possuem uma macroestrutura semelhante, mas tratamento de superfície, logo microtopografias diferentes, possuírem diferenças evidentes nos tempos associados ao processo de mineralização. Os implantes do grupo 3 revelaram actividade da fosfatase alcalina mais cedo do que os do grupo 1. Este aspecto associado ao padrão de crescimento observado através de Microscopia Electrónica de Varrimento, em que foi visível uma elevada complexidade organizacional, e a presença, aos 28 dias, de numerosos depósitos mineralizados, mostrou o excelente desempenho dos implantes do grupo 3, confirmando, desta forma, a influência que a microtopografia exerce na resposta biológica. Pela análise da actividade enzimática, também foi evidente o melhor desempenho dos implantes do grupo 6 comparativamente com os implantes do grupo 2, tendo essa actividade começado mais cedo no grupo 6, apresentando ambos a mesma macroestrutura mas tratamentos de superfície e microtopografias diferentes. Para os implantes dos grupos 1 e

2 não foi evidente nenhuma diferença na actividade desta enzima. Estes eram ambos maquinados, embora com macroestrutura diferente.

A análise dos níveis do Ca_i presentes no meio, ao longo de todo o período de cultura, pode ser considerado um quantificador do processo de mineralização uma vez que para que ocorra a formação de depósitos de fosfato de cálcio no meio extracelular, é necessário o consumo de Ca_i e P_i , provenientes do meio de cultura. A observação do consumo do cálcio ionizado permite reforçar algumas das tendências observadas pela análise da actividade da fosfatase alcalina. O consumo do Ca_i começou ligeiramente antes para os implantes do grupo 3 e um pouco mais tarde para os implantes do grupo 4. Os implantes maquinados dos grupos 1 e 2, não demonstraram diferenças com significado estatístico, entre si. Observaram-se diferenças evidentes, com um melhor comportamento biológico dos implantes pertencentes ao grupo 5 em relação aos implantes do grupo 4, o que confirma a evolução da superfície do primeiro relativamente ao segundo e, foi também evidente o melhor desempenho dos implantes do grupo 3 comparativamente com os do grupo 1, implantes que têm a mesma macroestrutura mas superfícies diferentes. O início do consumo de Ca_i revelou-se mais precoce e mais acentuado para os implantes do grupo 6 comparativamente com os do grupo 2, grupos cujos implantes têm a mesma macroestrutura mas diferentes tratamentos de superfície.

Deste estudo e concretamente, da observação da actividade da fosfatase alcalina, do consumo de Ca_i e do padrão de crescimento celular foi possível tirar conclusões e verificar tendências relativamente à influência da topografia, concretamente a influência da microtopografia e da rugosidade na resposta biológica *in vitro*. O mesmo não foi possível para a composição química. Foi observada a indução que os implantes do grupo 3 causaram na resposta biológica, sendo possível verificar a influência do tipo de tratamento de superfície e, conseqüentemente, da microtopografia. De facto, o padrão de crescimento celular e a observação de depósitos mineralizados demonstraram um bom desempenho dos implantes dos grupos 3 e 5 relativamente aos demais, com uma complexidade organizacional maior do que a observada nos demais grupos. A presença destes depósitos permitiu ainda verificar que o comportamento dos implantes dos grupos 3, 5 e 6 foi melhor do que o dos demais. Desta forma, foi possível confirmar a importância que o tipo de tratamento de superfície pode desempenhar, já que o grupo 3 demonstrou um comportamento melhor do que os grupos 1 e 5. Este último grupo, por sua vez, apresentou um comportamento melhor do que o grupo 4. Não foi tão evidente a diferença induzida pela macroestrutura, pelo menos, quando se consideram implantes maquinados e se compara a resposta biológica entre eles.

Em conclusão, foi assim possível, com este trabalho, demonstrar a influência da microtopografia e da rugosidade dos implantes, na resposta biológica, com diferentes

superfícies de titânio comercialmente puro, não sendo possível estabelecer conclusões relativamente à influência da composição química das superfícies, nessa mesma resposta.

Por outro lado, e com base no facto de implantes submetidos ao mesmo tipo de tratamento de superfície, poderem apresentar comportamentos biológicos distintos, ficou evidente que não é suficiente indicar o tipo de tratamento realizado, devendo os implantes ser caracterizados quanto à sua rugosidade e composição química de superfície. Isto porque, actualmente, não se discute mais se as superfícies tratadas apresentam superioridade em relação às lisas mas sim, qual o melhor tratamento a que os implantes devem ser submetidos para obter as melhores texturas superficiais, susceptíveis de desencadear a melhor e mais rápida resposta biológica. Tudo isto com o único e enorme objectivo que é permitir responder às exigências crescentes da implantologia oral e aos desafios cada vez mais complexos que se colocam ao implantologista, tais como, permitir a colocação de implantes em função mais precocemente bem como a sua utilização com comprimentos sucessivamente menores, em osso alveolar de densidade inferior ou ainda, em zonas sujeitas a regeneração óssea.

CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitiram obter as seguintes conclusões:

1. Foi possível agrupar, com base em imagens obtidas através de Microscopia Electrónica de Varrimento, os seis tipos de implantes em dois padrões principais, com microtopografia distinta. Um formado pelos implantes maquinados e o outro formado pelos restantes implantes, com superfície tratada.
2. A avaliação qualitativa dos três grupos de implantes submetidos a jactamento e ataque ácido mostrou que protocolos diferentes de um mesmo tipo de tratamento de superfície, dão origem a microtopografias variadas.
3. A determinação da rugosidade média superficial mostrou que implantes com o mesmo tipo de superfície não apresentam necessariamente valores iguais ou mesmo sobreponíveis.
4. Com base em valores de rugosidade média, os seis grupos de implantes foram ordenados, por ordem crescente, em maquinados, jactados e submetidos a ataque ácido e revestidos a *spray* de plasma de titânio, com limites de rugosidade bem definidos, e não sobreponíveis, tendo em conta os três tipos de tratamento.
5. Foram obtidos valores de rugosidade média inferiores a 0,50 μm para os implantes maquinados; valores situados entre 0,70 μm e 1,21 μm para os implantes submetidos a jactamento e ataque ácido e valores superiores a 2,50 μm , para os implantes TPS.
6. Implantes submetidos ao mesmo tipo de tratamento podem apresentar valores diferentes, com significado estatístico, conforme se observou ao comparar as rugosidades médias dos implantes pertencentes aos grupos 3, 4 e 5.
7. De acordo com os valores obtidos e com base na classificação de Wennerberg e Albrektsson, a superfície dos implantes maquinados analisados é considerada lisa, a dos implantes submetidos a jactamento e ataque ácido variou entre o minimamente e o moderadamente rugoso, e a dos implantes TPS foi considerada muito rugosa;

8. No caso dos implantes em que foi possível proceder a medições da rugosidade, nas quatro zonas inicialmente admitidas, foram observadas diferenças entre os valores medidos. Essas diferenças foram estatisticamente significativas no caso dos implantes maquinados, não o tendo sido no caso dos implantes TPS.
9. A composição química do núcleo dos seis implantes, todos eles confeccionados em titânio comercialmente puro, revelou-se relativamente estável, e semelhante entre si, independentemente do tipo de tratamento de superfície a que foram submetidos.
10. A composição química da superfície dos implantes revelou-se mais variável e mais susceptível de ser influenciada por factores externos.
11. Os três elementos químicos observados em maior percentagem, à superfície dos implantes, foram o oxigénio, o titânio e o carbono.
12. Os implantes TPS revelaram maiores percentagens de titânio e oxigénio, comparativamente ao observado para os implantes maquinados e para os submetidos a jacteamto e ataque ácido, tendo essas diferenças significado estatístico.
13. Foram observados vários outros elementos, em concentrações bastante inferiores, destacando-se, pela negativa, o elemento chumbo encontrado apenas nos implantes maquinados, dos grupos 1 e 2.
14. Não foi possível encontrar diferenças com significado estatístico, para os diferentes elementos químicos analisados, entre os implantes das classes 1, maquinados, e os da classe 2, submetidos a jacteamto e ataque ácido.
15. Confirmou-se a excelente biocompatibilidade dos implantes confeccionados em titânio comercialmente puro, já que todos promoveram a adesão celular à superfície dos implantes e a sua proliferação, independentemente do tipo de tratamento de superfície.
16. A diferenciação osteoblástica e a formação de depósitos minerais ocorreram em todas as superfícies analisadas, independentemente da macro e microtopografia do implante.
17. As superfícies com rugosidade média compreendida entre os 0,70 e os 1,21 μm , correspondentes a implantes jacteados e submetidos a ataque ácido, foram aquelas que apresentaram os melhores comportamentos biológicos, *in vitro*, para o conjunto dos parâmetros analisados.

18. O padrão de crescimento celular mostrou que implantes com o mesmo tipo de tratamento de superfície podem apresentar comportamento biológico diferente.
19. Os implantes submetidos a jacteamto e ataque ácido, pertencentes aos grupos 3 e 5, apresentaram um excelente desempenho *in vitro*, com a observação, aos 28 dias de cultura, de uma organização celular mais complexa e a formação de abundantes depósitos minerais, um início da actividade da fosfatase alcalina mais cedo e um consumo de cálcio ionizado, a partir do meio de cultura, mais rápido, do que o observado para os restantes implantes.
20. Os implantes do grupo 6, TPS, apresentaram actividade da fosfatase alcalina e consumo de cálcio ionizado, comparável ao observado para os implantes dos grupos 3 e 5, embora com as células a apresentarem uma organização do citoesqueleto e um padrão de crescimento menos complexo.
21. Os implantes do grupo 5 comprovaram, através da resposta biológica desencadeada, ser uma evolução dos implantes do grupo 4, ao apresentarem um melhor comportamento biológico.
22. Agrupar implantes sob o mesmo tipo de tratamento, sem caracterizar convenientemente as superfícies, sob o ponto de vista topográfico e de composição química, pode ser redutor já que se podem observar diferenças evidentes e significativas na resposta biológica desencadeada.
23. O tipo de tratamento de superfície e, conseqüentemente, a microtopografia e a rugosidade demonstraram influenciar a resposta biológica.
24. Não foi observada uma correlação evidente entre a composição química da superfície dos implantes e a resposta biológica desencadeada.

LINHAS DE INVESTIGAÇÃO FUTURAS

Muita investigação se tem realizado no campo da implantologia oral mas, como é muito frequentemente referido, ainda muito há a fazer para compreender completamente, um fenómeno que é complexo e que apresenta acontecimentos que começam a nível atómico e molecular e terminam ao nível celular e tecidual.

No seguimento do nosso trabalho é importante investigar e compreender o comportamento biológico destes mesmos implantes em condições *in vivo*, já que, muitas vezes, os resultados obtidos *in vitro* não são totalmente extrapoláveis. Desta forma, é nossa intenção, na fase seguinte, avaliar este comportamento em animais de experimentação e poder comparar os nossos resultados, obtidos *in vitro*, com os resultados a obter *in vivo*.

Por outro lado, conforme foi comentado anteriormente, é sabido que o sucesso da colocação de implantes dentários depende de uma tríade de factores; cirurgião, hospedeiro e implante. Muito se tem investido na formação de médicos-dentista, habilitando-os a colocar implantes, em situações cada vez mais críticas, com taxas de sucesso mais elevadas, embora nem sempre da melhor forma. Também muito se tem investido, em tempo e dinheiro, na investigação dos implantes, quer ao nível da sua macro, micro e, mais recentemente, nanoestrutura, sempre com o objectivo de acelerar e potenciar o fenómeno da osteointegração. A este nível, um dos campos de investigação que seguramente sofrerá grande evolução num futuro próximo será a composição química da superfície e a forma de a melhorar de modo a favorecer a osteogénese, particularmente no que diz respeito à rapidez e ao grau de integração óssea. A preferência irá no sentido de tornar as superfícies o mais bioactivas possível de modo a associar a retenção mecânica à química. Outra área importante de investigação futura será conhecer melhor as características dos hospedeiros no sentido de procurar e, se possível, “adaptar” os hospedeiros aos implantes. Aspectos como as características das células ectomesenquimatosas, das proteínas, das integrinas de superfície, da mobilização, diferenciação e proliferação dos osteoblastos, bem como da capacidade de se formarem neo-vasos no local, que seguramente desempenham um papel importante neste processo e no sucesso da implantologia, continuam a ser pouco ou nada investigados, permanecendo pouco conhecidos, não modificáveis e pouco valorizáveis. Parece assim evidente, e talvez em certa medida resida aí uma das linhas futuras de investigação, saber até que ponto as características do hospedeiro interferem com esse sucesso e de que forma podemos tornar mais favoráveis essas variáveis.

Habitualmente, a investigação não valoriza devidamente as características do hospedeiro, características essas que, em maior ou menor escala, poderão explicar o sucesso/insucesso que ocorre no dia-a-dia clínico, apesar da técnica cirúrgica e dos implantes utilizados serem os mesmos.

Por outro lado, a interface entre o osso e o implante, que constitui o local onde as interacções ocorrem, constitui um enorme campo de investigação, que ainda se encontra numa fase em desenvolvimento crescente. Muito há ainda a compreender, principalmente ao nível molecular. Seria interessante saber quais as biomoléculas que se adsorvem inicialmente, à superfície dos implantes, constituindo a primeira camada de moléculas. Seria igualmente interessante conhecer as que formam a segunda camada e as seguintes e que tipo de ligações se estabelecem entre elas. Para isso é necessário melhorar e criar novas metodologias de investigação que permitam responder a algumas questões que gostaríamos de esclarecer em projectos de investigação futuros. De entre elas destacamos:

1. De que forma, concretamente, a rugosidade e a microtopografia da superfície dos implantes influencia a diferenciação celular?
2. Qual a influência da composição química da superfície dos implantes na resposta biológica? Qual a interferência negativa da presença de contaminantes?

Bibliografia

1. Tavares A. História da implantologia. *Stoma*. 1993;26:17-31.
2. Ring M. *Dentistry - An illustrated history*. New York: Harry N. Abrams, Inc., Publishers; 1985;3-182.
3. White T, Degusta D, Richards G, Baker S. Brief communication: Prehistoric dentistry in the American Southwest: A drilled canine from Sky Aerie, Colorado. *Am J Phys Anthropol*. 1997;103:409-414.
4. Tavares A. Alguns aspectos da evolução histórica da velha arte dentária. *Rev Port Estomatol Cir Maxilofac*. 1966;VII(1):83-106.
5. Koritzer R. Apparent tooth preparation in a middle Mississippi Indian culture. *J Dent Res*. 1968;47:839.
6. Coppa A, Bondioli L, Cucina A, Frayer D, Jarrige C, Jarrige J-F, et al. Early Neolithic tradition of dentistry. *Nature*. 2006;440:755-756.
7. Slavkin H. Biomimicry, dental implants and clinical trials. *JADA*. 1998;129:226-230.
8. Powers J, Sakaguchi R. Scope and history of restorative materials. In: Powers J, Sakaguchi R *Craig's Restorative Dental Materials*. 12th ed. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier; 2006;1-5.
9. Lynch C, MacGillycuddy C, O'Sullivan V. Pierre Fauchard and his rôle in the development of obturators. *Br Dent J*. 2005;199:603-605.
10. Schulein T. Significant events in the history of operative dentistry. *J Hist Dent*. 2005;53(2):63-72.
11. Stanford C, Johnson G, Fakhry A, Gartton D, Mellonig J, Wagner W. Outcomes of a fluoride modified implant one year after loading in the posterior-maxilla when placed with the osteotome surgical technique. *Applied Osseointegration Res*. 2006;5:50-55.
12. Schliephake H, Hüls A, Müller M. Early loading of surface modified titanium implants in the posterior mandible - preliminary results. *Applied Osseointegration Res*. 2006;5:56-58.
13. Pinholt E. Surface engineered dental implant insertion in conjunction with bilateral inferior mandibular nerve transposition - a case report. *Applied Osseointegration Res*. 2006;5:59-61.
14. Oxby G, Lindqvist J, Nilsson P. Early loading of Astra Tech Osseospeed™ implants placed in thin alveolar ridges and fresh extraction sockets. *Applied Osseointegration Res*. 2006;5:68-72.

Bibliografia

15. Misch C. Base lógica dos implantes dentários. In: Misch C. Implantes Dentários Contemporâneos. 2ª ed. São Paulo: Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda; 2000;3-32.
16. Francischone C. Osseointegration and its benefits. In: Francischone C, Vasconcelos L, Brånemark P-I. Osseointegration and esthetics in single tooth rehabilitation. São Paulo: Quintessence Publishing Co, Ltd; 2002;3-9.
17. Wataha J. Review - materials for endosseous dental implants. J Oral Rehabilitation. 1996;23:79-90.
18. Anselme K, Linez P, Bigerelle M, Maguer DL, Maguer AL, Hardouin P, et al. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl₆V₄ surfaces on osteoblastic cell behavior. Biomat. 2000;21:1567-1577.
19. Zhao G, Zinger O, Schwartz Z, Wieland M, Landolt D, Boyan B. Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure. Clin Oral Impl Res. 2006;17:258-264.
20. Vercaigne S, Wolke J, Naert I, Jansen J. Bone healing capacity of titanium plasma-sprayed and hydroxylapatite-coated oral implants. Clin Oral Impl Res. 1998;9:261-271.
21. Albrektsson T, Brånemark P-I, Hansson H-A, Linström J. Osseointegrated titanium implants - requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in Man. Acta Orthop Scand. 1981;52:155-170.
22. Kieswetter K, Schwartz Z, Dean D, Boyan B. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. Crit Rev Oral Biol Med. 1996;7(4):329-345.
23. Stanford C. Application of oral implants to the general dental practice. JADA. 2005;136:1092-1100.
24. Kasemo B, Lausmaa J. Material-tissue interfaces: The role of surface properties and processes. Environ Health Perspect. 1994;102:41-45.
25. Taborelli M, Jobin M, François P, Vaudaux P, Tonetti M, Szmukler-Moncler S, et al. Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium (I) Surface characterization. Clin Oral Impl Res. 1997;8:208-216.
26. Steinemann S. Titanium - the material of choice? Periodontol. 1998;17:7-21.
27. Galli C, Guizzardi S, Passeri G, Martini D, Tinti A, Mauro G, et al. Comparison of human mandibular osteoblasts grown on two commercially available titanium implant surfaces. J Periodontol. 2005;76:364-372.

28. Buser D, Schenk R, Steinemann S, Fiorellini J, Fox C, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mat Res.* 1991;25:889-902.
29. Schwartz Z, Lohmann C, Oefinger J, Bonewald L, Dean D, Boyan B. Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv Dent Res.* 1999;13:38-48.
30. Sul Y-T, Johansson C, Albrektsson T. Which surface properties enhance bone response to implants? Comparison of oxidized magnesium, TiUnite, and osseotite implant surfaces. *Int J Prosthodont.* 2006;19:319-329.
31. Wong M, Eulenberger J, Schenk R, Hunziker E. Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *J Biomed Mat Res.* 1995;29:1567-1575.
32. Cochran D, Nummikoski P, Higginbottom F, Hermann J, Makins S, Buser D. Evaluation of an endosseous titanium implant with sand-blasted and acid-etched surface in the canine mandible: radiographic results. *Clin Oral Impl Res.* 1996;7:240-252.
33. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1 - Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and In vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 2004;17:536-543.
34. Bagnò A, Bello CD. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *J Mat Sci: Mat Med.* 2004;15:935-949.
35. Juodzbaly G, Sapragnienė M, Wennerberg A, Baltrukonis T. Titanium dental implant surface micromorphology optimization. *J Oral Implantol.* 2007;33(4):177-185.
36. Sul Y-T, Jeong Y, Johansson C, Albrektsson T. Oxidized, bioactive implants are rapidly and strongly integrated in bone. Part I - experimental implants. *Clin Oral Impl Res.* 2006;17:521-526.
37. Biesbrock A, Edgerton M. Evaluation of the clinical predictability of hydroxyapatite-coated endosseous dental Implants: A review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995;10:712-720.
38. Jeffcoat M, McGlumphy E, Reddy M, Geurs N, Proskin H. A comparison of hydroxyapatite (HA)-coated threaded, HA-coated cylindrical, and titanium threaded endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18:406-410.
39. Cooley D, Dellen AV, Burgess J, Windeler A. The advantages of coated titanium implants prepared by radiofrequency sputtering from hydroxyapatite. *J Prosthetic Dent.* 1992;67:93-100.

Bibliografia

40. Albrektsson T. Oral implant surfaces: Part 2 - Review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont*. 2004;17:544-564.
41. Albrektsson T, Sennerby L, Wennerberg A. State of the art of oral implants. *Periodontol*. 2000;47:15-26.
42. Rudy R, Levi P, Bonacci F, Weisgold A, Engler-Hamm D. Intraosseous anchorage of dental prostheses: an early 20th century contribution. *Compendium of Continuing education in dentistry*. 2008;29(4):220-231.
43. Tavares A. Implantes de Alumina e de Zircónia - Estudo experimental comparativo. [Tese de Doutoramento]. Faculdade de Medicina. Universidade de Lisboa; 1994.
44. Brånemark P-I. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw: experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1977;16:Suppl.
45. Arvidson K, Bystedt H, Frykholm A, Konow Lv, Lothigius E. Five-year prospective follow-up report of the Astra Tech Dental implant system in the treatment of edentulous mandibles. *Clin Oral Impl Res*. 1998;9:225-234.
46. McGlumphy E, Peterson L, Larsen P, Jeffcoat M. Prospective study of 429 hydroxyapatite-coated cylindrical Omniloc implants placed in 121 patients. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18:82-92.
47. Buser D, Mericske-Stern R, Bernard J, Behneke A, Hirt H, Belser U, et al. 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 Impl Res*. 1997;8:161-172.
48. Deporter D, Watson P, Pharoah M, Levy D, Todescan R. Five- to six-year results of a prospective clinical trial using the ENDOPORE® dental implant and a mandibular overdenture. *Clin Oral Impl Res*. 1999;10:95-102.
49. Jungner M, Lundqvist P, Lundgren S. Oxidized titanium implants NobelBiocare® TiUnite™ compared with turned titanium implants (NobelBiocare® mark III™) with respect to implant failure in a group of consecutive patients treated with early functional loading and two-stage protocol. *Clin Oral Impl Res*. 2005;16:308-312.
50. 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 Impl*. 1986;1(1):11-25
51. Smith D, Zarb G. Criteria for success of osseointegrated endosseous implants. *J Prosthetic Dent*. 1989;62:567-572.

Bibliografia

52. Cooper L, Masuda T, Whitson W, Yliheikkilä P, Felton D. Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14:37-47.
53. Davies J. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*. 1998;17:22-35.
54. Wennerberg A, Albrektsson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15:331-344.
55. Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Impl Res*. 1998;9:11-19.
56. Wennerberg A, Albrektsson T, Lausmaa J. Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25- and 75- μm -sized particles of Al_2O_3 . *J Biomed Mat Res*. 1996;30:251-260.
57. Wennerberg A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B. Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomater*. 1996;17:15-22.
58. Wennerberg A. Searching for the right surface. *Forum Implantologicum*. 2006;2(1):10-13.
59. Ogawa T, Saruwatari L, Takeuchi K, Aita H, Ohno N. Ti nano-nodular structuring for bone integration and regeneration. *J Dent Res*. 2008;87(8):751-756.
60. Wennerberg A, Albrektsson T. Implant surfaces beyond micron roughness. Experimental and clinical knowledge of surface topography and surface chemistry. *Appl Osseointeg Res*. 2006;5:40-44.
61. Albrektsson T, Jacobsson M. Bone-metal interface in osseointegration. *J Prosthetic Dent* 1987;5(57):597-607.
62. Binon P. Implants and components: Entering the new millennium. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15(1):76-94.
63. Corso M, Sirota C, Fiorellini J, Rasool F, Szmukler-Moncler S, Weber H-P. Clinical and radiographic evaluation of early loaded free-standing dental implants with various coatings in beagle dogs. *J Prosthetic Dent*. 1999;82:428-435.
64. Vroom M, Sipos P, Lange Gd, Gründemann L, Timmerman M, Loos B, et al. Effect of surface topography of screw-shaped titanium implants in humans on clinical and

radiographic parameters: a 12-year prospective study. Clin Oral Impl Res. 2009;20(11):1231-1239.

65. Eckert S, Parein A, Myshin H, Padilla J. Validation of dental implant systems through a review of literature supplied by system manufacturers. J Prosthetic Dent. 1997;77:271-279.

66. Freshney R. Introduction. In: Freshney R, editor. Culture of animal cells - A manual of basic technique. 4th ed. New York: Wiley-liss; 2000.1-18.

67. Bruyn HD, Velde Tvd, Collaert B. Immediate functional loading of TiOblast dental implants in full-arch edentulous mandibles: a 3-year prospective study. Clin Oral Impl Res. 2008;19(7):717-723.

68. Ganeles J, Zöllner A, Jackowski J, Bruggenkate Ct, Beagle J, Guerra F. Immediate and early loading of Straumann implants with a chemically modified surface (SLActive) in the posterior mandible and maxilla: 1-year results from a prospective multicenter study. Clin Oral Impl Res. 2008;19:1119-1128.

69. Zarb G, Albrektsson T. Osseointegration: a requiem for the periodontal ligament? Guest Editorial. Int J Periodontics Restorative Dent. 1991;11:88-91.

70. Santos P, Alcoforado G. Conceitos biológicos dos implantes endo-ósseos. In: Alcoforado G, Redinha L. Reabilitação com implantes endo-ósseos. Lisboa: Lidel - Edições Técnicas, Lda; 2008;7-21.

71. Palmer R, Smith B, Howe L, Palmer P. Overview of implant dentistry. In: Palmer R, Smith B, Howe L, Palmer P. Implants in Clinical Dentistry. Abingdon, Oxon: Informa Healthcare; 2002;7-10.

72. http://www.laimplants.net/FredStalley_DI_Types.htm#Subperiosteal_Implants. Redondo Beach, CA2005 [actualizado em 2006/03/23; consultado em 2009/09/11].

73. Gladwin M, Bagby M. Clinical aspects of dental materials. In: Gladwin M, Bagby M. Clinical aspects of dental materials Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000;164.

74. Misch C, Misch C. Terminologia genérica dos componentes com forma radicular. In: Misch C. Implantes Dentários Contemporâneos. 2ª ed. São Paulo: Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda; 2000;13-5.

75. Kasemo B, Lausmaa J. Selección del metal y características de la superficie. In: Branemark P-I, Zarb G, Albrektsson T. Prótesis tejido-integradas: La osseointegración en la odontología clínica. Berlin: Quintessence; 1987;99-116.

Bibliografia

76. Lacefield W. Materials characteristics of uncoated/ceramic-coated implant materials. *Adv Dent Res*. 1999;13:21-26.
77. Morra M, Cassinelli C, Bruzzone G, Carpi A, Santi GD, Giardino R, et al. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 1. Surface analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18:40-45.
78. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B. Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminum oxide. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11:38-45.
79. Hansson S. The dental implant meets bone - a clash of two paradigms. *Applied Osseointegration Res*. 2006;5:5-17.
80. Caramês J. Contribuição para o estudo do comportamento biomecânico de diferentes modelos de implantes endósseos - Estudo experimental no cão Beagle. [Tese de Doutorado]. Faculdade de Medicina Dentária. Universidade de Lisboa; 2001.
81. Misch C, Bidez M. Fundamentos científico lógico do design do implante dentário. In: Misch C. *Implantes Dentários Contemporâneos*. 2ª ed. São Paulo: Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda; 2000;329-43.
82. Scheid JWR. *Woelfel's dental anatomy: Its relevance to dentistry* Fifth ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1997.
83. Shalabi M, Gortemaker A, Hof MVt, Hansen J, Creugers N. Implant surface roughness and bone healing: a systematic review. *J Dent Res*. 2006;85(6):496-500.
84. Lim Y, Oshida Y, Andres C, Barco M. Surface characterizations of variously treated titanium materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001;16:333-342.
85. Mummery L. Surfaces. In: Mummery L. *Surface texture analysis - The handbook*. Muhlhausen: Hommelwerke GmbH; 1992;1-7.
86. Eisenbarth E, Linez P, Biehl V, Velten D, Breme J, Hildebrand H. Cell orientation and cytoskeleton organisation on ground titanium surfaces. *Biomolecular Engineering*. 2002;19:233-237.
87. Mustafa K, Lopez B, Hultenby K, Wennerberg A, Arvidson K. Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surfaces blasted with TiO₂ particles - A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin Oral Impl Res*. 1998;9:195-207.

88. Massaro C, Rotolo P, Riccardis FD, Milella E, Napoli A, Wieland M, et al. Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium implants. Part I: chemical composition. *J Mat Sci: Mat Med.* 2002;13:535-548.
89. Nanci A, Wuest J, Peru L, Sharma V, Sharma S, Zalzal S, et al. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mat Res.* 1998;40:324-335.
90. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran D, et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mat Res.* 2005;74A(1):49-58.
91. Hamdan M, Blanco L, Khraisat A, Tresguerres I. Influence of titanium surface charge on fibroblast adhesion. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2006;8(1):32-38.
92. Feng B, Weng J, Yang B, Qu S, Zhang X. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. *Biomaterials.* 2003;24:4663-4670.
93. Smith D, Pilliar R, Metson J, McIntyre N. Dental implant materials. II. Preparative procedures and surface spectroscopic studies. *J Biomed Mat Res.* 1991;25:1069-1084.
94. Ramires P, Romito A, Cosentino F, Milella E. The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour. *Biomat.* 2001;22:1467-474.
95. Ellingsen J, Johansson C, Wennerberg A, Holmën A. Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19:659-666.
96. Stanford C, Schneider G, Masaki C, Zaharias R, Seabold D, Eckdhal J, et al. Effects of fluoride-modified titanium dioxide grit blasted implant surfaces on platelet activation and osteoblast differentiation. *Appl Osseointeg Res.* 2006;5:24-30.
97. Capilla M, Olid M, Olmedo M. Cylindrical dental implants with hydroxyapatite- and titanium plasma spray-Coated surfaces: 5-year results. *J Oral Implantol.* 2007;33(2):59-68.
98. Ohgushi H, Okumura M, Yoshikawa T, Inoue K, Senpuku N, Tamai S. Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite. *J Biomed Mat Res.* 1992;26:885-895.
99. Sul Y-T, Johansson C, Byon E, Albrektsson T. The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive titanium implants. *Biomat.* 2005;26:6720-6730.

Bibliografia

100. Sul Y-T, Johansson C, Albrektsson T. Oxidized titanium screws coated with calcium ions and their performance in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17:625-634.
101. Nayab S, Shinawi L, Horkirk J, Tate T, Olsen I, Jones F. Adhesion of bone cells to ion-implanted titanium. *J Mat Sci: Mat Med*. 2003;14:991-997.
102. Sul Y-T, Byon E-SE-S, Jeong Y. Biomechanical measurements of calcium-incorporated oxidized implants in rabbit bone: Effect of calcium surface chemistry of a novel implant. *Clin Imp Dent and Related Dent*. 2004;6(2):101-110.
103. Hanawa T, Kamiura Y, Yamamoto S, Kohgo T, Amemiya A, Ukai H, et al. Early bone formation around calcium-ion-implanted titanium inserted into rat tibia. *J Biomed Mat Res*. 1997;36:131-136.
104. Chesmel K, Black J. Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. I. A novel *in vitro* model system. *J Biomed Mat Res*. 1995;29:1089-1099.
105. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomat*. 2000;21:667-681.
106. Puleo D, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomat*. 1999;20:2311-2321.
107. Cochran D. A comparison of endosseous dental implant surfaces. *J Periodontol*. 1999;70:1523-1539.
108. Gotfredsen K, Wennerberg A, Johansson C, Skovgaard L, Hjørting-Hansen E. Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: An experimental study in rabbits. *J Biomed Mat Res*. 1995;29:1223-1231.
109. Norton M. Marginal bone levels at single tooth implants with conical fixture design. The influence of surface macro- and microstructure. *Clin Oral Impl Res*. 1998;9:91-999.
110. Buser D, Brogini N, Wieland M, Schenk R, Denzer A, Cochran D, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res*. 2004;83(7):529-533.
111. Afonso A. Interação entre biomateriais e tecido ósseo. [Tese de Doutorado]. Faculdade de Medicina Dentária . Universidade do Porto; 1998.
112. Bordji K, Jouzeau J, Mainard D, Payan E, Netter P, Rie K, et al. Cytocompatibility of Ti₆Al₄V and Ti₅Al_{2.5}Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts. *Biomat*. 1996;17:929-940.

113. Denissen H, Klein C, Visch L, Hooff Avd. Behavior of calcium phosphate coatings with different chemistries in bone. *Int J Prosthodont*. 1996;9:142-148.
114. Massaro C, Baker M, Cosentino F, Ramires P, Klose S, Milella E. Surface and biological evaluation of hydroxyapatite-based coatings on titanium deposited by different techniques. *Biomater*. 2001;58:651-657.
115. Li Z-l, Kitsugi T, Chang Y-S, Senaha Y, Takagi H, Nakamura T, et al. Bone-bonding behavior under load-bearing conditions of an alumina ceramic implant incorporating beads coated with glass-ceramic containing apatite and wollastonite. *J Biomed Mat Res*. 1995;29:1081-1088.
116. Kim H-W, Kim H-E, Salih V, Knowles J. Dissolution control and cellular responses of calcium phosphate coatings on zirconia porous scaffold. *J Biomed Mat Res*. 2004;68A:522-530.
117. Akagawa Y, Ichikawa Y, Nikai H, Tsuru H. Interface histology of unloaded and early loaded partially stabilized zirconia endosseous implant in initial bone healing. *J Prosthetic Dent*. 1993;69:599-604.
118. Chang Y-S, Oka M, Nakamura T, Gu H-O. Bone remodelling around implant ceramics. *J Biomed Mat Res*. 1996;30:117-124.
119. Passi P, Terribile V, Marin W, Parenti A, Miotti A. Ultrastructural findings on the interface between hydroxylapatite and oral tissues. *Quintessence Int*. 1991;22:193-197.
120. Jansen J, Waerden Jvd, Wolke J, Groot Kd. Histologic evaluation of the osseous adaptation to titanium and hydroxyapatite-coated titanium implants. *J Biomed Mat Res*. 1991;25:973-989.
121. Sul Y-T, Johansson C, Röser K, Albrektsson T. Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodised implants. *Biomater*. 2002;23:1809-1817.
122. Miculescu F, Bunea D, Ciocan L, Miculescu M, Antoniac I. Experimental researches concerning metabolic chemical phenomenon at the bone tissue-metallic implant interface. *European Cells and Materials*. 2005;9(Suppl 1):29-30.
123. Cabrini M, Cigada A, Rondelli G, Vincentini B. Effect of different surface finishing and of hydroxyapatite coatings on passive and corrosion current of Ti₆Al₄V alloy in simulated physiological solution. *Biomater*. 1997;18:783-787.
124. Andreiotelli M, Wenz H, Kohal R-J. Are ceramic implants a viable alternative to titanium implants? A systematic literature review. *Clin Oral Impl Res*. 2009;20(suppl 4):32-47.

Bibliografia

125. Radder A, Leenders H, Blitterswijk Cv. Bone-bonding behaviour of poly(ethylene oxide)-polybutylene terephthalate copolymer coatings and bulk implants: a comparative study. *Biomater*. 1995;16:507-513.
126. Bruijn Jd, Blitterswijk Cv, Davies J. Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface *in vivo*. *J Biomed Mat Res*. 1995;29:89-99.
127. Lee I-S, Kim D-H, Kim H-E, Jung Y-C, Han C-H. Biological performance of calcium phosphate films formed on commercially pure Ti by electron-beam evaporation. *Biomater*. 2002;23:609-615.
128. Downes S, Clifford C, Scotchford C, Klein C. Comparison of the release of growth hormone from hydroxyapatite, heat-treated hydroxyapatite, and fluoroapatite coatings on titanium. *J Biomed Mat Res*. 1995;29:1053-1060.
129. Villarreal D, Sogal A, Ong J. Protein adsorption and osteoblast responses to different calcium phosphate surfaces. *J Oral Implantol*. 1998;XXIV(2):67-73.
130. Ozawa S, Kasugai S. Evaluation of implant materials (hydroxyapatite, glass-ceramics, titanium) un rat bone marrow stromal cell culture. *Biomater*. 1996;17:23-29.
131. Berglundh T, Abrahamsson I, Albouy K-P, Lindhe J. Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: an experimental study in dogs. *Clin Oral Impl Res*. 2007;18:147-152.
132. Knabe C, Howlett C, Klar F, Zreiqat H. The effect of different titanium and hydroxyapatite-coated dental implant surfaces on phenotypic expression of human bone-derived cells. *J Biomed Mat Res*. 2004;71A:98-107.
133. Geurs N, Jeffcoat R, McGlumphy E, Reddy M, Jeffcoat M. Influence of implant geometry and surface characteristics on progressive osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17:811-815.
134. Dattilo D, Misch C, Arena S. Interface Analysis of hydroxyapatite-coated implants in a human vascularized iliac bone graft. *Int J Oral Maxillofacial Implants*. 1995;10:405-409.
135. Masuda T, Yliheikkilä P, Felton D, Cooper L. Generalization regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part I. *In vivo* studies. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998;13:17-29.
136. Hench L, Wilson J. Surface-active biomaterials. *Science*. 1984;226(4675):630-636.

Bibliografia

137. Depprich R, Zipprich H, Ommerborn M, Mahn E, Lammers L, Handschel J, et al. Osseointegration of zirconia implants: an SEM observation of the bone-implant interface. *Head Face Med.* 2008;4:25.
138. Gahlert M, Milz SRMWCSHKS. Osseointegration of zirconia and titanium dental implants: a histological and histomorphometrical study in the maxilla of pigs. *Clin Oral Impl Res.* 2009;20(11):1247-1253.
139. Pirker W, Kocher A. Immediate, non-submerged, root-analogue zirconia implants placed into single-rooted extraction sockets: 2-year follow-up of a clinical study *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009;38(11):1127-1132.
140. Burkitt H, Young B, Heath J. Skeletal tissues. In: Burkitt H, Young B, Heath J, editors. *Wheater's Functional Histology - A text and a colour atlas.* 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994;173-186.
141. Junqueira L, Carneiro J. Tecido ósseo. In: Carneiro J, editor. *Histologia básica.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 2004;136-153.
142. Moore K, Daley A. Introduction to clinically oriented anatomy In: Moore K, Daley A, editors. *Clinically oriented anatomy.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006;19-26.
143. Garg A. Bone physiology for dental implantology In: Garg A. *Bone - Biology, Harvesting, Grafting for Dental Implants - Rationale and Clinical Applications.* Chicago: Quintessence Publishing Co Inc.; 2004;3-20.
144. Berkovitz B, Holland G, Moxham B. Osso alveolar. In: Berkovitz B, Holland G, Moxham B. *Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal.* 3ª ed. São Paulo: Artmed Editora SA; 2004; 205-218.
145. Watzek G. Mechanisms of bone development, remodeling, and loss. In: Gruber R. *Implants in qualitatively compromised bone* London: Quintessence Publishing Co, Ltd; 2004; 18-20.
146. Meghji S. Bone remodelling. *Br Dent J.* 1992;172:235-242.
147. Roberts W, Garetto L. Fisiologia e metabolismo ósseos. In: Misch C. *Implantes Dentários Contemporâneos.* São Paulo: Livraria Santos Editora Com. Imp. Lda; 2000;225-236.
148. Miles T, Nauntofte B, Svensson P. Bone and calcium metabolism. In: Miles T. *Clinical oral physiology.* Copenhagen: Quintessence Publishing Co, Ltd; 2004;281-292.

Bibliografía

149. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001;10:S96-S101.
150. Aldecoa E, Ortiz I. Principios básicos para la regeneración ósea. In: Aldecoa E, Ortiz I. *Un nuevo enfoque en la regeneración ósea - plasma rico en factores de crecimiento (PRGF)*. Vitoria: Puesta al Día Publicaciones, S.L.; 2000.
151. Abrahamsson I, Berglundh T. Effects of different implant surfaces and designs on marginal bone-level alterations: a review. *Clin Oral Impl Res.* 2009;20(4):207-215.
152. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang N, Lindhe J. *De novo* alveolar bone formation adjacent to endosseous implants - A model study in the dog. *Clin Oral Impl Res.* 2003;14:251-262.
153. Abrahamsson I, Berglundh T, Linder E, Lang N, Lindhe J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces - an experimental study in the dog. *Clin Oral Impl Res.* 2004;15:381-392.
154. Meyer U, Joos U, Stamm T, Hohoff A, Fillies T, Stratmann U, et al. Ultrastructural characterization of the implant/bone interface of immediately loaded dental implants. *Biomater.* 2004;25:1959-1967.
155. Sagara M, Akagawa Y, Nikai H, Tsuru H. The effect of early occlusal loading on one-stage titanium alloy implants in beagle dogs: a pilot study. *J Prosthetic Dent.* 1993;69:281-288.
156. Futami T, Fujii N, Ohnishi H, Taguchi N, Kusakari H, Ohshima H, et al. Tissue response to titanium implants in the rat maxilla: ultrastructural and histochemical observations of the bone-titanium interface. *J Periodontol.* 2000;71:287-298.
157. Schenk R, Hjørting-Hansen E, Buser D. Bone integration implants. *Forum Implantologicum.* 2006;2(1):14-23.
158. Mustafa K, Wroblewski J, Hulténby K, Lopez B, Arvidson K. Effects of titanium surfaces blasted with TiO₂ particles on the initial attachment of cells derived from human mandibular bone - A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin Oral Impl Res.* 2000;11:116-128.
159. Abrahamsson I, Zitzmann N, Berglundh T, Wennerberg A, Lindhe J. Bone and soft tissue integration to titanium implants with different surface topography: An experimental study in the dog. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001;16:323-332.
160. Moursi A, Globus R, Damsky C. Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Science.* 1997;110:2187-2196.

161. Rosengren A, Johansson B, Danielsen N, Thomsen P, Ericson L. Immunohistochemical studies on the distribution of albumin, fibrinogen, fibronectin, IgG and collagen around PTFE and titanium implants. *Biomater*. 1996;17:1779-1786.
162. Boyan B, Hummert T, Dean D, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomater*. 1996;17:137-146.
163. Sinha R, Tuan R. Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone*. 1996;18(5):451-457.
164. Xiao G, Wang D, Benson M, Karsenty G, Franceschi R. Role of the α_2 -integrin in osteoblastic-specific gene expression and activation of the *Osf2* transcription factor. *J Biol Chem*. 1998;273(49):32988-32994.
165. Takeuchi Y, Suzawa M, Kikuchi T, Nishida E, Fujita T, Matsumoto T. Differentiation and transforming growth factor- β receptor down-regulation by collagen- $\alpha_2\beta_1$ integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells. *J Biol Chem*. 1997;272(46):29309-29316.
166. Osathanon T, Bessinyowong K, Arksornnukit M, Takahashi H, Pavasant P. TiAl_6Nb_7 promotes cell spreading and fibronectin and osteopontin synthesis in osteoblast-like cells. *J Mat Sci: Mat Med*. 2006;17:619-625.
167. Isa Z, Schneider G, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of fluoride-modified titanium surfaces on osteoblast proliferation and gene expression. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006;21:203-211.
168. Schneider G, Zaharias R, Stanford C. Osteoblast integrin adhesion and signaling regulate mineralization. *J Dent Res*. 2001;80(6):1540-1544.
169. Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert T, Cochran D, Simpson J, Dean D, et al. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG63 cells. *J Biomed Mat Res*. 1996;32:55-63.
170. Guizzardi S, Galli C, Martini D, Belletti S, Tinti A, Raspanti M, et al. Different titanium surface treatment influences human mandibular osteoblast response. *J Periodontol*. 2004;75:273-282.
171. Lincks J, Boyan B, Blanchard C, Lohmann C, Liu Y, Cochran D, et al. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomater*. 1998;19:2219-2232.
172. Zreiqat H, Howlett C. Titanium substrate composition influences osteoblastic phenotype: *In vitro* study. *J Biomed Mat Res*. 1999;47:360-366.

Bibliografia

173. Martin J, Schwartz Z, Hummert T, Schraub D, Simpson J, Jr JL, et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res.* 1995;29:389-401.
174. Abron A, Hopfensperger M, Thompson J, Cooper L. Evaluation of a predictive model for implant surface topography effects on early osseointegration in the rat tibia model. *J Prosthetic Dent.* 2001;85:40-46.
175. Boyan B, Lossdörfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann C, Cochran D, et al. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *European Cells and Materials.* 2003;6:22-27.
176. Ferraz M, Fernandes M, Cabral A, Santos J, Monteiro F. *In vitro* growth and differentiation of osteoblast-like human bone marrow cells on glass reinforced hydroxyapatite plasma-sprayed coatings. *J Mat Sci: Mat Med.* 1999;10:567-576.
177. Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez B, Arvidson K. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Impl Res.* 2001;12:515-525.
178. Jayaraman M, Meyer U, Bühner M, Joos U, Wiesmann H-P. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomater.* 2004;25:625-631.
179. Yliheikkilä P, Masuda T, Ambrose W, Suggs C, Felton D, Cooper L. Preliminary comparison of mineralizing multilayer cultures formed by primary fetal bovine mandibular osteoblasts grown on titanium, hydroxyapatite, and glass substrates. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996;11:456-465.
180. Boyan B, Bonewald L, Paschalis E, Lohmann C, Rosser J, Cochran D, et al. Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography. *Calcif Tissue Int.* 2002;71:519-529.
181. Rosa A, Beloti M. Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. *Braz Dent J.* 2003;14(1):16-21.
182. Anselme K, Bigerelle M, Noël B, Iost A, Hardouin P. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *J Biomed Mater Res.* 2002;60:529-540.
183. Hilbig H, Wiener T, Armbruster F, Bekele A, Kirsten M, Graf H-L. Effects of dental implant surfaces on the expression of bone sialoprotein in cells derived from human mandibular bone. *Med Sci Monit.* 2005;11(4):BR111-BR115.

184. Groessner-Schreiber B, Tuan R. Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultures on titanium surfaces *in vitro*. J Cell Sci. 1992;101:209-217.
185. Cooper L. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. J Prosthetic Dent. 2000;84:522-534.
186. Martin J, Dean D, Cochran D, Simpson J, Boyan B, Schwartz Z. Proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63) cultured on previously used titanium surfaces. Clin Oral Impl Res. 1996;7:27-37.
187. Boyan B, Batzer R, Kieswetter K, Liu Y, Cochran D, Szmuckler-Moncler S, et al. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. J Biomed Mater Res. 1998;39:77-85.
188. Boyan B, Lohmann C, Dean D, Sylvia V, Cochran D, Schwartz Z. Mechanisms involved in osteoblast response to implant surface morphology. Annu Rev Mater Res. 2001;31:357-371.
189. Buser D, Nydegger T, Hirt H, Cochran D, Nolte L-P. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. Int J Oral Maxillofac Implants. 1998;13:611-619.
190. Sammons R, Lumbikanonda N, Gross M, Cantzler P. Comparison of osteoblast spreading on microstructured dental implant surfaces and cell behaviour in an explant model of osseointegration - A scanning electron microscopic study. Clin Oral Impl Res. 2005;16:657-666.
191. Ivanoff C-J, Widmark G, Johansson C, Wennerberg A. Histologic evaluation of bone response to oxidized and turned titanium micro-implants in human jawbone. Int J Oral Maxillofac Implants. 2003;18:341-348.
192. Park J, Davies J. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. Clin Oral Impl Res. 2000;11:530-539.
193. Lohmann C, Bonewald L, Sisk M, Sylvia V, Cochran D, Dean D, et al. Maturation state determines the response of osteogenic cells to surface roughness and $1,25\text{-Dihydroxyvitamin D}_3$. J Bone Miner Res. 2000;15(6):1169-1180.
194. Sisk M, Lohmann C, Cochran D, Sylvia V, Simpson J, Dean D, et al. Inhibition of cyclooxygenase by indomethacin modulates osteoblast response to titanium surface roughness in a time-dependent manner. Clin Oral Impl Res. 2001;12:52-61.

Bibliografia

195. Lohmann C, Tandy E, Sylvia V, Hell-Vocke A, Cochran D, Dean D, et al. Response of normal female human osteoblasts (NHOst) to 17β -estradiol is modulated by implant surface morphology. *J Biomed Mat Res.* 2002;62:204-213.
196. Boyan B, Sylvia V, Liu Y, Sagun R, Cochran D, Lohmann C, et al. Surface roughness mediates its effects on osteoblasts via protein kinase A and phospholipase A₂. *Biomater.* 1999;20:2305-2310.
197. Vezeau P, Koorbusch G, Draughn R, Keller J. Effects of multiple sterilization on surface characteristics and in vitro biologic responses to titanium. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996;54:738-746.
198. Cassinelli C, Morra M, Bruzzone G, Carpi A, Santi GD, Giardino R, et al. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 2. In vitro experiments. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18:46-52.
199. Stanford C, Keller J, Solursh M. Bone cell expression on titanium surfaces is altered by sterilization treatments. *J Dent Res.* 1994;73(5):1061-1071.
200. Wennerberg A, Albrektsson T, Ulrich H, Krol J. An optical three-dimensional technique for topographical descriptions of surgical implants. *J Biomed Eng.* 1992;14:412-418.
201. Wennerberg A, Ohlsson R, Rosén B-G, Andersson B. Characterizing three-dimensional topography of engineering and biomaterial surfaces by confocal laser scanning and stylus techniques. *Med Eng Phys.* 1996;18(7):548-556.
202. Szmukler-Moncler S, Testori T, Bernard J. Etched Implants: A comparative surface analysis of four implant systems. *Appl Biomater.* 2004;69B:46-57.
203. Juodzbaly G, Sapragoniene M, Wennerberg A. New acid etched titanium dental implant surface. *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofac J.* 2003;5:1001-1105.
204. Mummery L. Parameters. In: Mummery L. *Surface texture analysis - The handbook.* Muhlhausen: Hommelwerke GmbH; 1992;23-59.
205. Udupa G, Singaperumal M, Sirohi R, Kothiyal M. Characterization of surface topography by confocal microscopy: II. The micro and macro surface irregularities. *Meas Sci Technol.* 2000;11:315-329.
206. Muralikrishnan B, Raja J. Surface finish parameters I: Amplitude, spacing, hybrid, and shape. In: Muralikrishnan B, Raja J, editors. *Computational Surface and Roundness Metrology.* London: Springer-Verlag London Limited; 2009;181-190.

207. Udupa G, Singaperumal M, Sirohi R, Kothiyal M. Characterization of surface topography by confocal microscopy: I. Principles and the measurement system. *Meas Sci Technol.* 2000;11:305-314.
208. Mummery L. Filtering. In: Mummery L. *Surface texture analysis - The handbook.* Muhlhausen: Hommelwerke GmbH; 1992;8-22.
209. Ghita R, Logofatu C, Negrila C, Manea A, Cernea M, Ciupina V, et al. XPS study of Ti/oxidized GaAs interface. *J Optoelectronics and Adv Mat.* 2006;8(1):31-36.
210. Kirkpatrick C, Mittermayer C. Theoretical and practical aspects of testing potential biomaterials in vitro. *J Mater Sci: Mater Med.* 1990;1:9-13.
211. Pearce A, Richards R, Milz S, Schneider E, Pearce S. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *European Cells and Materials.* 2007;13:1-10.
212. Costa M, Fernandes M. Proliferation/differentiation of osteoblastic human alveolar bone cell cultures in the presence of stainless steel corrosion products. *J Mat Sci: Mat Med.* 2000;11:141-153.
213. Keller J. Tissue compatibility to different surfaces of dental implants: In vitro studies. *Implant Dent.* 1998;7(4):331-337.
214. Mailhot J, Borke J. An isolation and *in vitro* culturing method for human intraoral bone cells derived from dental implant preparation sites. *Clin Oral Impl Res.* 1998;9:43-50.
215. Schwartz Z. Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. *J Biomed Mat Res.* 1996;30:145-155.
216. Schneider G, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J, et al. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *J Dent Res.* 2003;82(5):372-376.
217. Aubin J, Liu F, Malaval L, Gupta A. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone.* 1995;17(2 (Supplement)):77S-83S.
218. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall A, Karsenty G. *Osf2/Cbfa 1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 1997;89:747-754.
219. Masaki C, Schneider G, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clin Oral Impl Res.* 2005;16:650-656.

Bibliografía

220. Schneider G, Zaharias R, Seabold D, Keller J, Stanford C. Differentiation of preosteoblasts is affected by implant surface microtopographies. *J Biomed Mater Res.* 2004;69A:462-468.
221. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng J, Behringer R, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 2002;108:17-29.
222. Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, et al. Cbfa1 Isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biolog Chemistry.* 1999;274(11):6972-6978.
223. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997;89:755-764.
224. Cooper L, Harris C, Bruder S, Kowalski R, Kadiyala S. Incipient analysis of mesenchymal stem-cell-derived osteogenesis. *J Dent Res.* 2001;80(1):314-320.
225. Viornery C, Guenther H, Aronsson B-O, Péchy P, Descouts P, Grätzel M. Osteoblast culture on polished titanium disks modified with phosphonic acids. *J Biomed Mat Res.* 2002;62:149-155.
226. Terai K, Takano-Yamamoto T, Ohba Y, Hiura K, Sugimoto M, Sato M, et al. Role of osteopontin in bone remodelling caused by mechanical stress. *J Bone Miner Res.* 1999;14(6):839-849.
227. Ferraris M, Muñoz A. Cemento, Ligamento periodontal y hueso alveolar. In: Ferraris M, Muñoz A. *Histología y embriología bucodental.* Madrid: Editorial Médica Panamericana, S.A.; 2002;368-373.
228. Kang B-S, Sul Y-T, Oh S-J, Lee H-J, Albrektsson T. XPS, AES and SEM analysis of recent dental implants. *Acta Biomater.* 2009;5(6):2222-2229.
229. Sakai N, Wang R, Fujishima A, Watanabe T, Hashimoto K. Effect of ultrasonic treatment on highly hydrophilic TiO₂ surfaces. *Langmuir.* 1998;14:5918-5920.
230. Morra M, Cassinelli C. Evaluation of surface contamination of Titanium Dental Implants by LV-SEM: Comparison with XPS measurements. *Surface and Interface Anal.* 1997;25:983-988.
231. Zhu X, Chen J, Scheideler L, Reichl R. Effects of topography and composition of titanium surface oxide on osteoblast responses. *Biomater.* 2004;25:4087-4103.

Bibliografia

232. Coelho M, Fernandes M. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: Effect of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomat.* 2000;21:1095-102.
233. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the folin-phenol reagents. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
234. Weber H. The ITI story of rough implant surfaces. *Forum Implantologicum.* 2006;2(1):6-9.
235. Wennerberg A, Ektessabi A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B. A 1-year follow-up of implants of differing surface roughness placed in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997;12:486-494.
236. Misch C. Avaliação médica do paciente candidato a implante. In: Misch C. *Implantes Dentários Contemporâneos*. 2ª ed. São Paulo: Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda; 2000;33-65.
237. Cooper L, Masuda T, Yliheikkilä P, Felton D. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 1998;13:163-174.
238. Gebran M, Wassal T. Avaliação *in vitro* da adesão de osteoblastos sobre implantes osseointegráveis com superfície tratada (Titamax II®). *Implant news.* 2007;4(1):79-84.
239. Buser D, Nydegger T, Oxland T, Cochran D, Schenk R, Hirt H, et al. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mat Res.* 1999;45:75-83.
240. Ivanoff C-J, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Impl Res.* 2001;12:128-134.
241. Ellingsen J. The development of a bone regeneration promoting implant surface. *Appl Osseointeg Res.* 2006;5:18-23.
242. Lohmann C, Dean D, Köster G, Casasola D, Buchhorn G, Fink U, et al. Ceramic and PMMA particles differentially affect osteoblast phenotype. *Biomat.* 2002;23:1855-1863.
243. Jang K-S, Kim D-S. Surface roughness analysis of the AVANA dental implant. *J dentists.* 2000;38(10):956-961.

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

FIGURAS

Figura 2.1	– Superfície anisotrópica.....	18
Figura 2.2	– Superfície isotrópica.....	18
Figura 2.3	– Ângulo de contacto. A – ângulo elevado – material hidrofóbico. B – ângulo baixo – material hidrofílico.....	19
Figura 2.4	– Macroestrutura de um implante em forma de parafuso. A – Topo ou pico da espira; B – Vertente da espira; Fundo ou vale da espira...	49
Figura 2.5	– Diagrama representando o perfil hipotético de um implante dentário	50
Figura 2.6	– Diagrama representando a influência da ponta do ponteiro na medição do perfil. Dependendo do seu tamanho ocorrerá maior ou menor perda de informação.....	51
Figura 2.7	– Cinco perfis diferentes com o mesmo desvio médio de alturas (R_a).	52
Figura 2.8	– Perfil de um implante dentário mostrando o que é a forma, a ondulação e a rugosidade.....	53
Figura 3.1	– Um exemplar pertencente a cada um dos seis grupos de implantes.	63
Figura 3.2	– Implante do grupo 1. Maquinado I.....	64
Figura 3.3	– Implante do grupo 2. Maquinado II.....	64
Figura 3.4	– Implante do grupo 3. Jacteamto e ataque ácido I.....	65
Figura 3.5	– Implante do grupo 4. Jacteamto e ataque ácido II.....	65
Figura 3.6	– Implante do grupo 5. Jacteamto e ataque ácido III.....	66
Figura 3.7	– Implante do grupo 6. <i>Spray</i> de plasma de titânio (TPS).....	66

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

Figura 3.8	– Classe 1 - grupos 1 e 2, maquinados. Classe 2 - grupos 3, 4 e 5, tratados por jactamento e ataque ácido. Classe 3 - grupo 6, revestido por <i>spray</i> de plasma de titânio (TPS).	67
Figura 3.9	– Micrótopo de tecidos duros.	68
Figura 3.10	– Corte dos implantes.	68
Figura 3.11	– Imersão da porção cervical dos implantes em resina epofix.	68
Figura 3.12	– Porção cervical de um implante imersa em resina epofix.	68
Figura 3.13	– Implantes cortados	69
Figura 3.14	– Implantes colocados nos poços das placas de cultura	69
Figura 3.15	– Limpeza dos implantes em banho ultra-sónico.	70
Figura 3.16	– Estufa HERAEUS ELECTRONIC (Gaprüfte Sicherheit, Alemanha).	70
Figura 3.17	– Amostras colocadas em mangas individuais.	71
Figura 3.18	– Autoclave OMRON ESCS.	71
Figura 3.19	– Microscópio Electrónico de Varrimento, JEOL JSM6301F (CEMUP).	72
Figura 3.20	– Microscópio Confocal de Varrimento Laser, Leica SP2 AOBS SE (LeicaMicrosystems, Alemanha) (IBMC).	73
Figura 3.21	– Unidade ESCALAB 200A da VG Scientific (UK) com programa informático de aquisição e análise de dados PISCES (CEMUP).	73
Figura 3.22	– Unidade ESCALAB 200A da VG Scientific (UK) com programa informático de aquisição e análise de dados PISCES (CEMUP).	73
Figura 3.23	– Perfilómetro mecânico Hommel Werke, Turbo Wave V7.20 (Hommel AG, Hamburgo, Alemanha) (FEUP).	74
Figura 3.24	– Perfilómetro mecânico Hommel Werke, Turbo Wave V7.20 (Hommel AG, Hamburgo, Alemanha) (FEUP).	74
Figura 3.25	– Implantes montados em placa de carbono.	75

LISTA DE IMAGENS, TABELAS E GRÁFICOS

Figura 3.26	– Zona onde foram efectuados os registos das imagens, em microscopia confocal de varrimento laser, para determinação do perfil 3D dos implantes.....	76
Figura 3.27	– Implante no profilómetro e posicionamento do apalpador.....	76
Figura 3.28	– Identificação das zonas consideradas para efeitos de medição da rugosidade de superfície: e – fundo da espira; p – ponta; c – chanfro e ct – chanfro transversal.....	77
Figura 4.1	– Macrotopografia dos seis grupos de implantes analisados (30x, MEV). As diferenças de tamanho observadas estão relacionadas com o facto de os implantes utilizados apresentarem diâmetro diferente.....	88
Figura 4.2	– Microtopografia dos seis grupos de implantes analisados (100x, MEV).	90
Figura 4.3	– Microtopografia dos seis grupos de implantes analisados (500x, MEV).	91
Figura 4.4	– Microtopografia dos seis grupos de implantes analisados (2.000x, MEV).	92
Figura 4.5	– Imagem 3D de um implante do grupo 1. A e B – Fundo; C e D – Topo.	94
Figura 4.6	– Imagem 3D de um implante do grupo 2. A e B – Fundo; C e D – Topo.	95
Figura 4.7	– Imagem 3D de um implante do grupo 3. A e B – Fundo; C e D – Topo.	96
Figura 4.8	– Imagem 3D de um implante do grupo 4. A e B – Fundo; C e D – Topo.	97
Figura 4.9	– Imagem 3D de um implante do grupo 5. A e B – Fundo; C e D – Topo.	98
Figura 4.10	– Imagem 3D de um implante do grupo 6. A e B – Fundo; C e D – Topo.	99
Figura 4.11	– Morfologia celular às 3h de cultura, nas seis superfícies analisadas. Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento.....	133
Figura 4.12	– Morfologia celular às 24h de cultura, nas seis superfícies analisadas. Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento.....	134
Figura 4.13	– Morfologia celular aos 7 dias de cultura, nas seis superfícies analisadas. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser (400x).....	135

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

Figura 4.14 – Morfologia celular aos 21 dias de cultura, nas seis superfícies analisadas. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser (400x).....	136/137
Figura 4.15 – Padrão de crescimento celular ao longo dos 28 dias de cultura. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser e MEV (100x e 500x). Grupo 1 – Implante maquinado. A – crescimento celular perpendicular à orientação das irregularidades da superfície.....	138
Figura 4.16 – Padrão de crescimento celular ao longo dos 28 dias de cultura. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser e MEV (100x e 500x). Grupo 2 – implante maquinado. A e B – diferente orientação do crescimento celular entre as duas vertentes visíveis.....	139
Figura 4.17 – Padrão de crescimento celular ao longo dos 28 dias de cultura. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser e MEV (100x e 500x). Grupo 3 – implante submetido a jactamento e ataque ácido.....	140
Figura 4.18 – Padrão de crescimento celular ao longo dos 28 dias de cultura. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser e MEV (100x e 500x). Grupo 4 – implante submetido a jactamento e ataque ácido.....	141
Figura 4.19 – Padrão de crescimento celular ao longo dos 28 dias de cultura. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser e MEV (100x e 500x). Grupo 5 – implante submetido a jactamento e ataque ácido.....	142
Figura 4.20 – Padrão de crescimento celular ao longo dos 28 dias de cultura. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser e MEV (100x e 500x). Grupo 6 – implante TPS.....	143
Figura 4.21 – Expressão génica de marcadores osteoblásticos, avaliada por RT-PCR, no dia 21 de cultura, nos seis grupos de implantes.....	147
Figura 4.22 – Avaliação da mineralização da matriz extracelular em culturas com 28 dias. Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento. Implante do grupo 1 – Maquinado I.....	148

LISTA DE IMAGENS, TABELAS E GRÁFICOS

Figura 4.23 – Avaliação da mineralização da matriz extracelular em culturas com 28 dias. Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento. Implante do grupo 2 – Maquinado II.....	149
Figura 4.24 – Avaliação da mineralização da matriz extracelular em culturas com 28 dias. Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento. Implante do grupo 3 – Jacteamto e ataque ácido I....	150
Figura 4.25 – Avaliação da mineralização da matriz extracelular em culturas com 28 dias. Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento. Implante do grupo 4 – Jacteamto e ataque ácido II...	151
Figura 4.26 – Avaliação da mineralização da matriz extracelular em culturas com 28 dias. Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento. Implante do grupo 5 – Jacteamto e ataque ácido III..	152
Figura 4.27 – Avaliação da mineralização da matriz extracelular em culturas com 28 dias. Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento. Implante do grupo 6 – TPS.....	153
Figura 4.28 – Imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento, em grande ampliação (2.000x), da camada celular, presente na superfície dos seis grupos de implantes, no dia 28 de cultura. Observou-se a formação de depósitos globulares mineralizados, em todas as superfícies.....	154

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

TABELAS

Tabela 2.1	– Classificação dos implantes de acordo com a sua rugosidade média (R_a).....	17
Tabela 2.2	– Percentagem de ferro e oxigénio presente nos diferentes graus de titânio comercialmente puro e numa liga de titânio (% atómica).....	20
Tabela 3.1	– Localização das medições efectuadas com o profilómetro mecânico, para cada um dos grupos de implantes.....	77
Tabela 3.2	– <i>Primers</i> utilizados na análise da expressão génica.....	83
Tabela 4.1	– Valores obtidos, por profilometria mecânica, para os diferentes parâmetros de rugosidade analisados (valores expressos em μm)....	102
Tabela 4.2	– Valores obtidos, por profilometria mecânica, para a rugosidade média (R_a), em função da zona analisada (valores expressos em μm).....	104
Tabela 4.3	– Significância estatística para a comparação de valores de rugosidade média, entre grupos, com recurso ao teste U-Mann Whitney, uni-lateral (valores corrigidos em função do número de comparações efectuadas).....	108
Tabela 4.4	– Significância estatística para a comparação entre as quatro zonas analisadas, no grupo 2, com recurso ao teste Wilcoxon, uni-lateral (valores corrigidos em função do número de comparações efectuadas).....	109
Tabela 4.5	– Composição química da superfície de três implantes do grupo 1 (% atómica).....	117
Tabela 4.6	– Composição química da superfície de três implantes do grupo 2 (% atómica).....	117
Tabela 4.7	– Composição química da superfície de três implantes do grupo 3 (% atómica).....	117
Tabela 4.8	– Composição química da superfície de três implantes do grupo 4 (% atómica).....	118
Tabela 4.9	– Composição química da superfície de três implantes do grupo 5 (% atómica).....	118

LISTA DE IMAGENS, TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 4.10 – Composição química da superfície de três implantes do grupo 6 (% atômica).	118
Tabela 4.11 – Composição química obtida, considerando todos os dezoito implantes (% atômica).	119
Tabela 4.12 – Composição química, por grupo, considerando as três amostras de cada grupo (% atômica).	120
Tabela 4.13 – Composição química, por tipo de superfície, considerando as três classes de superfície analisadas (% atômica).	122
Tabela 4.14 – Estimativa de concentração (% atômica), para os diferentes elementos, para um intervalo de confiança a 95%.	125
Tabela 4.15 – Significância estatística para a comparação entre as três classes, relativa aos elementos C 1s, O 1s, P 2p, Ti 2p (2p1 + 2p3) e Pb 4f (4f5 + 4f7) (valores corrigidos em função do número de comparações efectuadas).....	127
Tabela 4.16 – Significância estatística para a comparação entre classes, com recurso ao teste U-Mann Whitney, uni-lateral, relativa aos elementos C 1s, O 1s, P 2p, Ti 2p (2p1 + 2p3) e Pb 4f (4f5 + 4f7) (valores corrigidos em função do número de comparações efectuadas).	127
Tabela 4.17 – Teste Manova para medidas repetidas.....	146
Tabela 4.18 – Teste Manova para medidas repetidas.....	157

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

GRÁFICOS

Gráfico 4.1	– Perfil de um implante do grupo 1, maquinado I.....	100
Gráfico 4.2	– Perfil de um implante do grupo 2, maquinado II.....	100
Gráfico 4.3	– Perfil de um implante do grupo 3, jacteamto e ataque ácido I....	101
Gráfico 4.4	– Perfil de um implante do grupo 4, jacteamto e ataque ácido II...	101
Gráfico 4.5	– Perfil de um implante do grupo 5, jacteamto e ataque ácido III..	101
Gráfico 4.6	– Perfil de um implante do grupo 6, revestido a <i>spray</i> de plasma de titânio.....	102
Gráfico 4.7	– Distribuição de extremos e quartis de R_a média global (implante), obtidos para os seis grupos de implantes.....	106
Gráfico 4.8	– Estimativa da rugosidade média, para cada um dos seis grupos de implantes, para um intervalo de confiança a 95%.....	107
Gráfico 4.9	– Espectro XPS correspondente a um implante do grupo 1.....	111
Gráfico 4.10	– Espectro XPS, de alta resolução, correspondente a um implante do grupo 1, mostrando os picos associados ao O, Ti e C.....	111
Gráfico 4.11	– Espectro XPS correspondente a um implante do grupo 2.....	112
Gráfico 4.12	– Espectro XPS, de alta resolução, correspondente a um implante do grupo 2, mostrando os picos associados ao O, Ti e C.....	112
Gráfico 4.13	– Espectro XPS correspondente a um implante do grupo 3.....	113
Gráfico 4.14	– Espectro XPS, de alta resolução, correspondente a um implante do grupo 3, mostrando os picos associados ao O, Ti e C.....	113
Gráfico 4.15	– Espectro XPS correspondente a um implante do grupo 4.....	114
Gráfico 4.16	– Espectro de XPS, de alta resolução, correspondente a um implante do grupo 4, mostrando os picos associados ao O, Ti e C..	114
Gráfico 4.17	– Espectro XPS correspondente a um implante do grupo 5.....	115
Gráfico 4.18	– Espectro de XPS, de alta resolução, correspondente a um implante do grupo 5, mostrando os picos associados ao O, Ti e C..	115
Gráfico 4.19	– Espectro XPS correspondente a um implante do grupo 6.....	116

LISTA DE IMAGENS, TABELAS E GRÁFICOS

Gráfico 4.20 – Espectro XPS, de alta resolução, correspondente a um implante do grupo 6, mostrando os picos associados ao O, Ti e C.	116
Gráfico 4.21 – Espectro da composição química de um implante do grupo 1 (Microanálise por raios X, EDS).....	129
Gráfico 4.22 – Espectro da composição química de um implante do grupo 2 (Microanálise por raios X, EDS).....	129
Gráfico 4.23 – Espectro da composição química de um implante do grupo 3 (Microanálise por raios X, EDS).....	130
Gráfico 4.24 – Espectro da composição química de um implante do grupo 4 (Microanálise por raios X, EDS).....	130
Gráfico 4.25 – Espectro da composição química de um implante do grupo 5 (Microanálise por raios X, EDS).....	131
Gráfico 4.26 – Espectro da composição química de um implante do grupo 6 (Microanálise por raios X, EDS).....	131
Gráfico 4.27 – Actividade de fosfatase alcalina nos seis grupos de implantes, ao longo dos 28 dias de cultura. * Diferenças com significado estatístico para os valores relativos ao implante maquinado do grupo 1 ($p < 0,05$).	144
Gráfico 4.28 – Actividade de fosfatase alcalina correspondente aos implantes dos grupos 1 e 2, ao longo dos 28 dias de cultura.	145
Gráfico 4.29 – Actividade de fosfatase alcalina correspondente aos implantes dos grupos 1 e 3, ao longo dos 28 dias de cultura. * Diferenças com significado estatístico para os valores relativos ao implante do grupo 1 ($p < 0,05$).	145
Gráfico 4.30 – Actividade de fosfatase alcalina correspondente aos implantes dos grupos 1, 4 e 5, ao longo dos 28 dias de cultura. * Diferenças com significado estatístico para os valores relativos ao implante do grupo 1 ($p < 0,05$).	146
Gráfico 4.31 – Actividade de fosfatase alcalina correspondente aos implantes dos grupos 1, 2 e 6, ao longo dos 28 dias de cultura. * Diferenças com significado estatístico para os valores relativos ao implante do grupo 1 ($p < 0,05$).	146

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

Gráfico 4.32 – Expressão génica de marcadores osteoblásticos, avaliada por RT-PCR., no dia 21 de cultura, nos seis grupos de implantes.....	147
Gráfico 4.33 – Espectro de difracção de Raios X representativo das estruturas globulares presentes nas culturas celulares, no dia 28 de cultura.....	154
Gráfico 4.34 – Evolução dos níveis de cálcio ionizado no meio de cultura ao longo do tempo de incubação. Culturas celulares mantidas por 33 dias. *Estatisticamente diferente dos valores relativos ao implante do grupo 1 ($p < 0,05$), para os implantes dos grupos 3, 5 e 6.....	155
Gráfico 4.35 – Evolução dos níveis de Ca_i , no meio de cultura, ao longo do tempo de incubação, para os implantes dos grupos 1 e 2.....	156
Gráfico 4.36 – Evolução dos níveis de Ca_i , no meio de cultura, ao longo do tempo de incubação, para os implantes dos grupos 1 e 3. * Diferenças com significado estatístico para os valores relativos ao implante do grupo 1 ($p < 0,05$).....	156
Gráfico 4.37 – Evolução dos níveis de Ca_i , no meio de cultura, ao longo do tempo de incubação, para os implantes dos grupos 1, 4 e 5. * Diferenças com significado estatístico para os valores relativos ao implante do grupo 1 ($p < 0,05$).....	157
Gráfico 4.38 – Evolução dos níveis de Ca_i , no meio de cultura, ao longo do tempo de incubação, para os implantes dos grupos 1, 2 e 6. * Diferenças com significado estatístico para os valores relativos ao implante do grupo 1 ($p < 0,05$).....	157

ANEXOS

ANEXO 1

Análise descritiva - Rugosidade média global (R_a) por grupo de implantes

Case Processing Summary							
		Cases					
		Valid		Missing		Total	
	Grupos	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Rugosidade média global	Maquinado I	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%
	Maquinado II	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%
	Jacteado I	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%
	Jacteado II	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%
	Jacteado III	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%
	Plasma	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%

Descriptives					
	Grupos			Statistic	Std. Error
Rugosidade média global	Maquinado I	Mean		,1767	,01213
		95% Confidence Interval for Mean		,1487	
		Lower Bound			
		Upper Bound		,2046	
		5% Trimmed Mean		,1757	
		Median		,1800	
		Variance		,001	
		Std. Deviation		,03640	
		Minimum		,13	
		Maximum		,24	
	Range		,11		
	Interquartile Range		,0600		
	Skewness		,544	,717	
	Kurtosis		-,486	1,400	
	Maquinado II	Mean		,2631	,01873
		95% Confidence Interval for Mean		,2199	
		Lower Bound			
Upper Bound		,3062			
5% Trimmed Mean		,2615			
Median		,2575			
Variance		,003			
Std. Deviation		,05618			
Minimum		,19			
Maximum		,37			
Range		,19			
Interquartile Range		,0775			
Skewness		,580	,717		
Kurtosis		,315	1,400		

ANEXOS

Descriptives

Grupos			Statistic	Std. Error	
Jacteado I	Mean		,7344	,02319	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,6810		
		Upper Bound	,7879		
	5% Trimmed Mean		,7308		
	Median		,7200		
	Variance		,005		
	Std. Deviation		,06957		
	Minimum		,66		
	Maximum		,88		
	Range		,22		
	Interquartile Range		,0950		
	Skewness		1,183	,717	
	Kurtosis		1,378	1,400	
	Jacteado II	Mean		,8022	,02722
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,7394	
Upper Bound			,8650		
5% Trimmed Mean			,8041		
Median			,8200		
Variance			,007		
Std. Deviation			,08167		
Minimum			,66		
Maximum			,91		
Range			,25		
Interquartile Range			,1350		
Skewness			-,358	,717	
Kurtosis			-,416	1,400	
Jacteado III		Mean		1,2100	,05153
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1,0912	
	Upper Bound		1,3288		
	5% Trimmed Mean		1,2056		
	Median		1,1900		
	Variance		,024		
	Std. Deviation		,15460		
	Minimum		1,03		
	Maximum		1,47		
	Range		,44		
	Interquartile Range		,2700		
	Skewness		,610	,717	
	Kurtosis		-,799	1,400	

ANEXOS

Descriptives

Grupos			Statistic	Std. Error
Plasma	Mean		2,5242	,07862
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2,3429	
		Upper Bound	2,7055	
	5% Trimmed Mean		2,5269	
	Median		2,5300	
	Variance		,056	
	Std. Deviation		,23586	
	Minimum		2,08	
	Maximum		2,92	
	Range		,84	
	Interquartile Range		,2675	
	Skewness		-,315	,717
	Kurtosis		1,091	1,400

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
Grupos	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
Rugosidade média global	Maquinado I	,135	9	,200(*)	,953	9	,726
	Maquinado II	,120	9	,200(*)	,968	9	,880
	Jacteado I	,163	9	,200(*)	,918	9	,378
	Jacteado II	,142	9	,200(*)	,967	9	,870
	Jacteado III	,151	9	,200(*)	,924	9	,426
	Plasma	,204	9	,200(*)	,970	9	,893

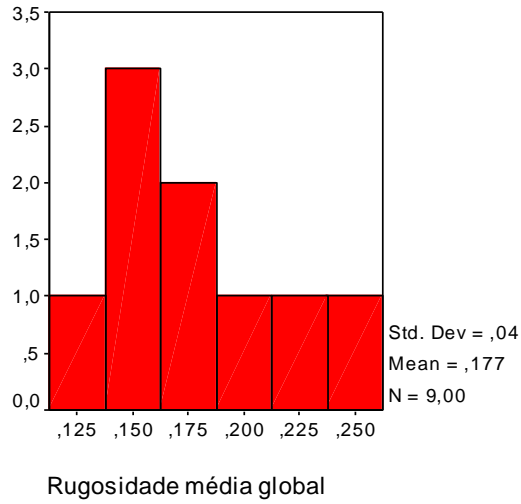
* This is a lower bound of the true significance.
a Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance

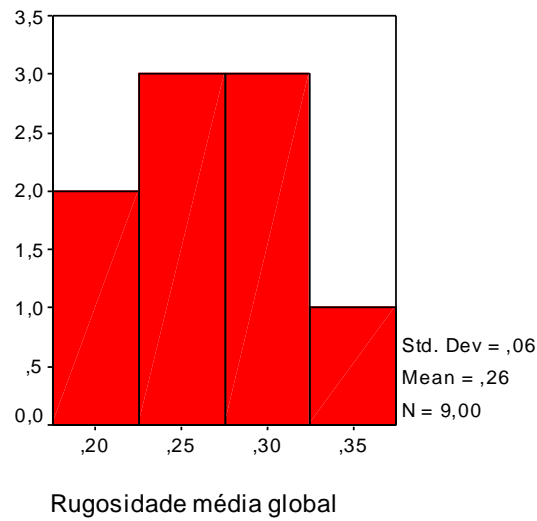
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Rugosidade média global	Based on Mean	3,968	5	48	,004
	Based on Median	3,697	5	48	,007
	Based on Median and with adjusted df	3,697	5	17,111	,019
	Based on trimmed mean	3,909	5	48	,005

Rugosidade média global (R_a)

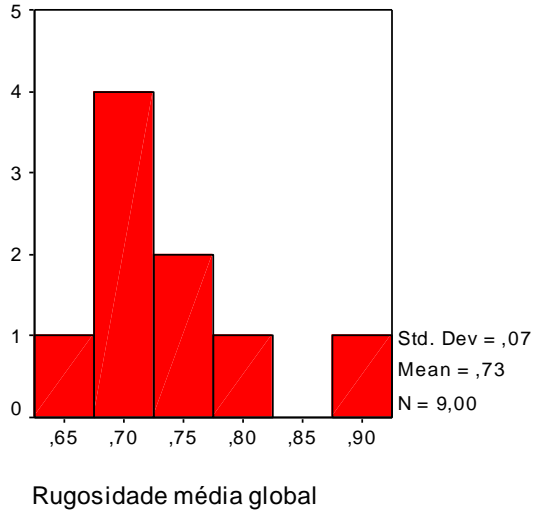
MAQUINADO I – Grupo 1



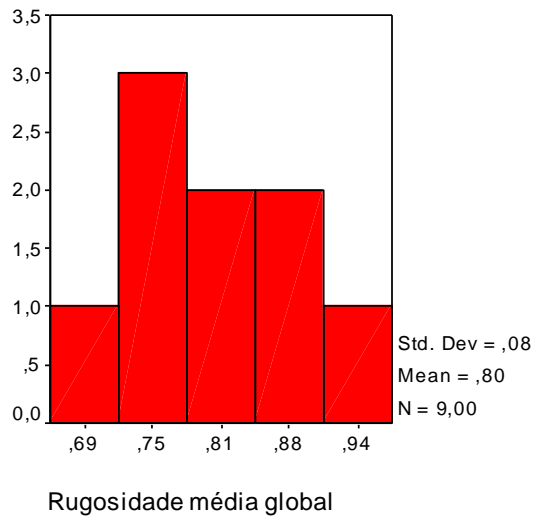
MAQUINADO II – Grupo 2



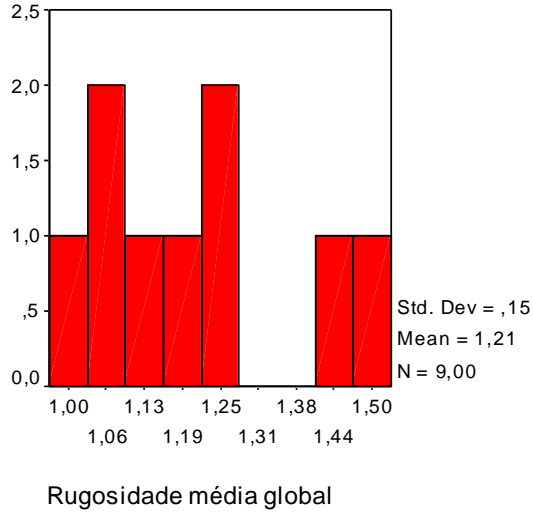
JACTEADO I – Grupo 3



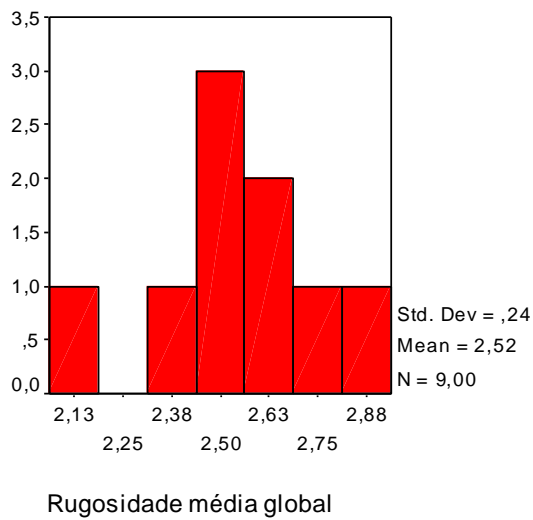
JACTEADO II – Grupo 4



JACTEADO III – Grupo 5



PLASMA – Grupo 6



ANEXOS

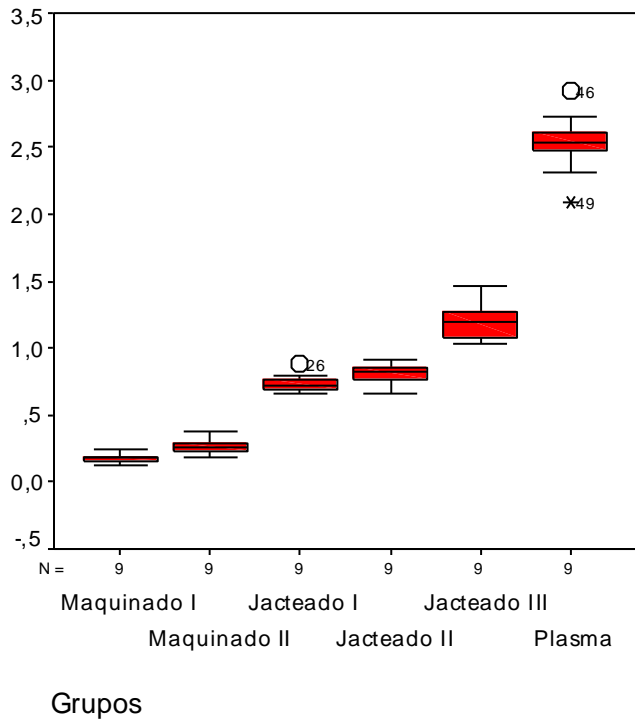
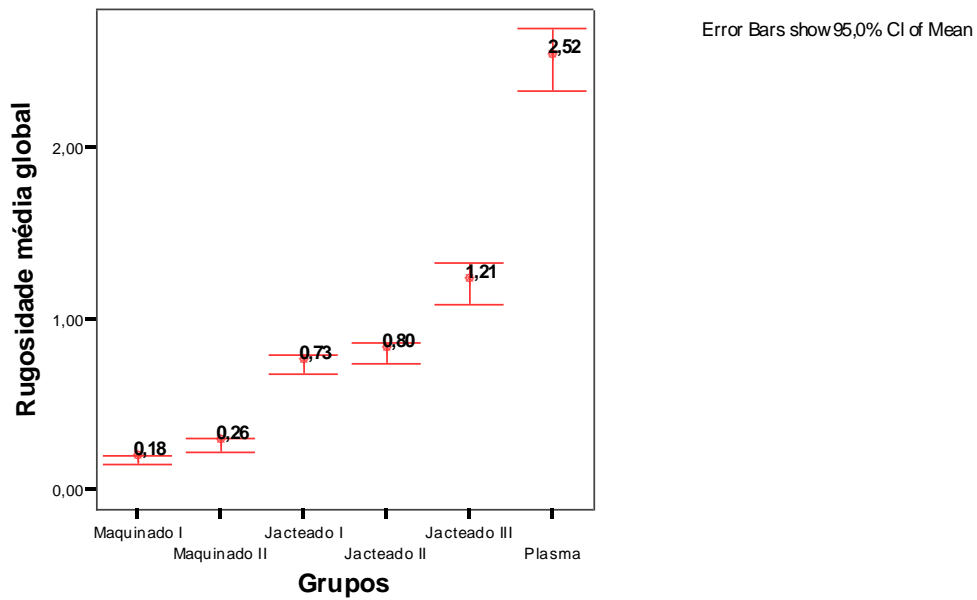


Gráfico de estimativa da rugosidade média (R_a)

Intervalos de confiança (0,95) (R_a)



ANEXO 2 – Rugosidade média (R_a), para cada grupo de implantes, por localização analisada.

Maquinados I

Descriptive Statistics

	N		Minimum		Maximum		Mean		Std. Deviation	
	Statistic	Error	Statistic	Error	Statistic	Error	Statistic	Error	Statistic	Error
Média chanfro	9		,13		,24		,1767	,0121	,0364	0
Valid N (listwise)	9									

Maquinados II

Descriptive Statistics

	N		Minimum		Maximum		Mean		Std. Deviation	
	Statistic	Error	Statistic	Error	Statistic	Error	Statistic	Error	Statistic	Error
Média chanfro	9		,15		,55		,3089	,0413	,1240	4
Média CT	9		,31		,51		,3967	,0190	,0570	1
Média espira	9		,07		,14		,1078	,0068	,0204	8
Média ponta	9		,14		,31		,2389	,0200	,0598	8
Valid N (listwise)	9									

Jacteamento I

Descriptive Statistics										
	N		Minimum		Maximum		Mean		Std. Deviation	
	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error
Média chanfro	9		,63		,85		,7389	,0231	,06918	
Média CT	9		,60		,93		,7300	,0316	,09474	
Valid N (listwise)	9									

Jacteamento II

Descriptive Statistics										
	N		Minimum		Maximum		Mean		Std. Deviation	
	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error
Média espira	9		,66		,91		,8022	,0272	,08167	
Valid N (listwise)	9									

Jactemento III

Descriptive Statistics

	N		Minimum		Maximum		Mean		Std. Deviation	
	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error
Média espira	9		1,03		1,47		1,210	,0515	,1546	0
Valid N (listwise)	9									

Plasma

Descriptive Statistics

	N		Minimum		Maximum		Mean		Std. Deviation	
	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error
Média chanfro	9		2,45		3,66		2,802	,1340	,4018	9
Média CT	9		1,92		2,98		2,520	,1217	,3650	7
Média espira	9		1,07		3,29		2,404	,2669	,8007	2
Média ponta	9		2,14		2,80		2,370	,0709	,2128	4
Valid N (listwise)	9									

ANEXOS

ANEXO 3 – Comparação da rugosidade média global (R_a), inter-grupos

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Rugosidade média global	54	,9518	,79998	,13	2,92
Grupos	54	3,50	1,724	1	6

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Grupos	N	Mean Rank
Rugosidade média global	Maquinado I	9	5,78
	Maquinado II	9	13,22
	Jacteado I	9	25,22
	Jacteado II	9	29,78
	Jacteado III	9	41,00
	Plasma	9	50,00
	Total		54

Test Statistics(a,b)

	Rugosidade média global
Chi-Square	49,996
df	5
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test
b. Grouping Variable: Grupos

ANEXOS

ANEXO 4 – Comparação da rugosidade média global (R_a), intra-grupos

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rugosidade média global	Maquinado I	9	5,78	52,00
	Maquinado II	9	13,22	119,00
	Total	18		

Test Statistics(b)	
	Rugosidade média global
Mann-Whitney U	7,000
Wilcoxon W	52,000
Z	-2,961
Asymp. Sig. (2-tailed)	,003
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,002
Exact Sig. (1-tailed)	,001
Point Probability	,000

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Grupos

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rugosidade média global	Maquinado I	9	5,00	45,00
	Jacteado I	9	14,00	126,00
	Total	18		

Test Statistics(b)	
	Rugosidade média global
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,578
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Grupos

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rugosidade média global	Maquinado I	9	5,00	45,00
	Jacteado II	9	14,00	126,00
	Total	18		

Test Statistics(b)	
	Rugosidade média global
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,580
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Grupos

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rugosidade média global	Maquinado I	9	5,00	45,00
	Jacteado III	9	14,00	126,00
	Total	18		

Test Statistics(b)	
	Rugosidade média global
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,580
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Grupos

ANEXOS

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rugosidade média global	Maquinado I	9	5,00	45,00
	Plasma	9	14,00	126,00
	Total	18		

Test Statistics(b)	
	Rugosidade média global
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,578
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Grupos

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rugosidade média global	Maquinado II	9	5,00	45,00
	Jacteado I	9	14,00	126,00
	Total	18		

Test Statistics(b)	
	Rugosidade média global
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,578
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Grupos

ANEXOS

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rugosidade média global	Maquinado II	9	5,00	45,00
	Jacteado II	9	14,00	126,00
	Total	18		

Test Statistics(b)	
	Rugosidade média global
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,580
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Grupos

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rugosidade média global	Maquinado II	9	5,00	45,00
	Jacteado III	9	14,00	126,00
	Total	18		

Test Statistics(b)	
	Rugosidade média global
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,580
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Grupos

ANEXOS

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rugosidade média global	Maquinado II	9	5,00	45,00
	Plasma	9	14,00	126,00
	Total	18		

Test Statistics(b)	
	Rugosidade média global
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,578
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Grupos

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rugosidade média global	Jacteado I	9	7,22	65,00
	Jacteado II	9	11,78	106,00
	Total	18		

Test Statistics(b)	
	Rugosidade média global
Mann-Whitney U	20,000
Wilcoxon W	65,000
Z	-1,813
Asymp. Sig. (2-tailed)	,070
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,077(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,073
Exact Sig. (1-tailed)	,036
Point Probability	,004

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Grupos

ANEXOS

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rugosidade média global	Jacteado I	9	5,00	45,00
	Jacteado III	9	14,00	126,00
	Total	18		

Test Statistics(b)	
	Rugosidade média global
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,578
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Grupos

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rugosidade média global	Jacteado I	9	5,00	45,00
	Plasma	9	14,00	126,00
	Total	18		

Test Statistics(b)	
	Rugosidade média global
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,576
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Grupos

ANEXOS

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rugosidade média global	Jacteado II	9	5,00	45,00
	Jacteado III	9	14,00	126,00
	Total	18		

Test Statistics(b)	
	Rugosidade média global
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,580
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Grupos

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rugosidade média global	Jacteado II	9	5,00	45,00
	Plasma	9	14,00	126,00
	Total	18		

Test Statistics(b)	
	Rugosidade média global
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,578
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Grupos

ANEXOS

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rugosidade média global	Jacteado III	9	5,00	45,00
	Plasma	9	14,00	126,00
	Total	18		

Test Statistics(b)	
	Rugosidade média global
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,578
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Grupos

ANEXOS

ANEXO 5 – Comparação da rugosidade média global (R_a), intra-localização – Implantes do grupo 6

NPar Tests Friedman Test

Ranks	
	Mean Rank
Média chanfro	3,06
Média CT	2,89
Média espira	2,39
Média ponta	1,67

Test Statistics(a)	
N	9
Chi-Square	6,371
df	3
Asymp. Sig.	,095
Exact Sig.	,091
Point Probability	,003

a. Friedman Test

ANEXOS

ANEXO 6 – Comparação da rugosidade média global (R_a), inter-localização – Implantes do grupo 2

NPar Tests Friedman Test

Ranks	
	Mean Rank
Média chanfro	2,94
Média CT	3,83
Média espira	1,00
Média ponta	2,22

Test Statistics(a)	
N	9
Chi-Square	23,494
df	3
Asymp. Sig.	,000
Exact Sig.	,000
Point Probability	,000

a. Friedman Test

ANEXOS

ANEXO 7 – Comparação da rugosidade média global (R_a), intra-localização – Implantes do grupo 2

NPar Tests Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks				
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Média CT - Média chanfro	Negative Ranks	1(a)	1,50	1,50
	Positive Ranks	7(b)	4,93	34,50
	Ties	1(c)		
	Total	9		

a Média CT < Média chanfro
b Média CT > Média chanfro
c Média CT = Média chanfro

Test Statistics(b)	
Média CT - Média chanfro	
Z	-2,313(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. (2-tailed)	,023
Exact Sig. (1-tailed)	,012
Point Probability	,008

a Based on negative ranks.
b Wilcoxon Signed Ranks Test

NPar Tests Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks				
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Média espira - Média chanfro	Negative Ranks	9(a)	5,00	45,00
	Positive Ranks	0(b)	,00	,00
	Ties	0(c)		
	Total	9		

a Média espira < Média chanfro
b Média espira > Média chanfro
c Média espira = Média chanfro

Test Statistics(b)	
Média espira - Média chanfro	
Z	-2,668(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,008
Exact Sig. (2-tailed)	,004
Exact Sig. (1-tailed)	,002
Point Probability	,002

a Based on positive ranks.
b Wilcoxon Signed Ranks Test

NPar Tests

Wilcoxon Signed Ranks Test

		Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Média ponta - Média chanfro	Negative Ranks	7(a)	5,64	39,50
	Positive Ranks	2(b)	2,75	5,50
	Ties	0(c)		
	Total	9		

a Média ponta < Média chanfro
b Média ponta > Média chanfro
c Média ponta = Média chanfro

Test Statistics(b)	
	Média ponta - Média chanfro
Z	-2,018(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,044
Exact Sig. (2-tailed)	,043
Exact Sig. (1-tailed)	,021
Point Probability	,004

a Based on positive ranks.
b Wilcoxon Signed Ranks Test

NPar Tests

Wilcoxon Signed Ranks Test

		Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Média espira - Média CT	Negative Ranks	9(a)	5,00	45,00
	Positive Ranks	0(b)	,00	,00
	Ties	0(c)		
	Total	9		

a Média espira < Média CT
b Média espira > Média CT
c Média espira = Média CT

Test Statistics(b)	
	Média espira - Média CT
Z	-2,673(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,008
Exact Sig. (2-tailed)	,004
Exact Sig. (1-tailed)	,002
Point Probability	,002

a Based on positive ranks.
b Wilcoxon Signed Ranks Test

ANEXOS

NPar Tests Wilcoxon Signed Ranks Test

		Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Média ponta - Média CT	Negative Ranks	9(a)	5,00	45,00
	Positive Ranks	0(b)	,00	,00
	Ties	0(c)		
	Total	9		

a Média ponta < Média CT
b Média ponta > Média CT
c Média ponta = Média CT

Test Statistics(b)	
	Média ponta - Média CT
Z	-2,668(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,008
Exact Sig. (2-tailed)	,004
Exact Sig. (1-tailed)	,002
Point Probability	,002

a Based on positive ranks.
b Wilcoxon Signed Ranks Test

NPar Tests Wilcoxon Signed Ranks Test

		Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Média ponta - Média espira	Negative Ranks	0(a)	,00	,00
	Positive Ranks	9(b)	5,00	45,00
	Ties	0(c)		
	Total	9		

a Média ponta < Média espira
b Média ponta > Média espira
c Média ponta = Média espira

Test Statistics(b)	
	Média ponta - Média espira
Z	-2,668(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,008
Exact Sig. (2-tailed)	,004
Exact Sig. (1-tailed)	,002
Point Probability	,002

a Based on negative ranks.
b Wilcoxon Signed Ranks Test

ANEXOS

ANEXO 8 – Estatística descritiva da concentração dos elementos químicos analisados, por implante

Caracterização dos implantes constituintes dos seis grupos(a)

				C 1s	N 1s	O 1s
Grupo	Maquinado I	1		,5835	,0147	,2721
		2		,5017	,0156	,3219
		3		,4544	,0131	,3519
		Total	N	3	3	3
			Minimum	,4544	,0131	,2721
			Maximum	,5835	,0156	,3519
			Range	,1291	,0025	,0798
		Mean	,513200	,014467	,315300	
	Maquinado II	1		,4530	,0280	,3597
		2		,4180	,0237	,3816
		3		,4390	,0257	,3676
		Total	N	3	3	3
			Minimum	,4180	,0237	,3597
			Maximum	,4530	,0280	,3816
			Range	,0350	,0043	,0219
		Mean	,436667	,025800	,369633	
Jactemento com ataque ácido I	1		,4082	,0186	,3999	
	2		,4256	,0268	,3766	
	3		,4313	,0298	,3682	
	Total	N	3	3	3	
		Minimum	,4082	,0186	,3682	
		Maximum	,4313	,0298	,3999	
		Range	,0231	,0112	,0317	
	Mean	,421700	,025067	,381567		
Jactemento com ataque ácido II	1		,4349	,0344	,3610	
	2		,4278	,0286	,3775	
	3		,4911	,0313	,3337	
	Total	N	3	3	3	
		Minimum	,4278	,0286	,3337	
		Maximum	,4911	,0344	,3775	
		Range	,0633	,0058	,0438	
	Mean	,451267	,031433	,357400		

ANEXOS

Caracterização dos implantes constituintes dos seis grupos(a)

		C 1s	N 1s	O 1s	
Jacteamiento com ataque ácido III	1	,5847	,0203	,2815	
	2	,5460	,0172	,3090	
	3	,6891	,0161	,2132	
	Total	N	3	3	3
		Minimum	,5460	,0161	,2132
		Maximum	,6891	,0203	,3090
		Range	,1431	,0042	,0958
	Mean	,606600	,017867	,267900	
Plasma	1	,1785	,0245	,5370	
	2	,3361	,0198	,4353	
	3	,2996	,0170	,4716	
	Total	N	3	3	3
		Minimum	,1785	,0170	,4353
		Maximum	,3361	,0245	,5370
		Range	,1576	,0075	,1017
	Mean	,271400	,020433	,481300	
Total	N	18	18	18	
	Minimum	,1785	,0131	,2132	
	Maximum	,6891	,0344	,5370	
	Range	,5106	,0213	,3238	
	Mean	,450139	,022511	,362183	

Caracterização dos implantes constituintes dos seis grupos

a Limited to first 100 cases.

Percentagem atómica dos elementos carbono, azoto e oxigénio obtida para cada implante analisado. Valores máximos, mínimos, amplitude e média por grupo e para a totalidade dos 18 implantes.

ANEXOS

Caracterização dos implantes constituintes dos seis grupos(a)

			F 1s	Al 2p	Si 2p	
Grupo	Maquinado I	1	,0047	,0445	,0109	
		2	,0068	,0482	,0098	
		3	,0087	,0599	,0132	
		Total	N	3	3	3
			Minimum	,0047	,0445	,0098
			Maximum	,0087	,0599	,0132
			Range	,0040	,0154	,0034
		Mean	,006733	,050867	,011300	
	Maquinado II	1	,0040	,0285	,0200	
		2	,0021	,0294	,0080	
		3	,0042	,0219	,0139	
		Total	N	3	3	3
			Minimum	,0021	,0219	,0080
			Maximum	,0042	,0294	,0200
		Range	,0021	,0075	,0120	
	Mean	,003433	,026600	,013967		
Jacteamto com ataque ácido I	1	,0004	,0189	,0095		
	2	,0045	,0185	,0141		
	3	,0037	,0210	,0354		
	Total	N	3	3	3	
		Minimum	,0004	,0185	,0095	
		Maximum	,0045	,0210	,0354	
		Range	,0041	,0025	,0259	
	Mean	,002867	,019467	,019667		
Jacteamto com ataque ácido II	1	,0063	,0578	,0154		
	2	,0047	,0526	,0126		
	3	,0055	,0435	,0129		
	Total	N	3	3	3	
		Minimum	,0047	,0435	,0126	
		Maximum	,0063	,0578	,0154	
		Range	,0016	,0143	,0028	
	Mean	,005500	,051300	,013633		

ANEXOS

Caracterização dos implantes constituintes dos seis grupos(a)

		F 1s	Al 2p	Si 2p	
Jacteamto com ataque ácido III	1	,0020	,0137	,0091	
	2	,0027	,0131	,0072	
	3	,0015	,0037	,0061	
	Total	N	3	3	3
		Minimum	,0015	,0037	,0061
		Maximum	,0027	,0137	,0091
		Range	,0012	,0100	,0030
	Mean	,002067	,010167	,007467	
Plasma	1	,0063	,0128	,0075	
	2	,0059	,0091	,0097	
	3	,0054	,0115	,0072	
	Total	N	3	3	3
		Minimum	,0054	,0091	,0072
		Maximum	,0063	,0128	,0097
		Range	,0009	,0037	,0025
	Mean	,005867	,011133	,008133	
Total	N	18	18	18	
		Minimum	,0004	,0037	,0061
		Maximum	,0087	,0599	,0354
		Range	,0083	,0562	,0293
		Mean	,004411	,028256	,012361

Caracterização dos implantes constituintes dos seis grupos

a Limited to first 100 cases.

Anexo 3 – Percentagem atômica dos elementos flúor, alumínio e silício obtida para cada implante analisado. Valores máximos, mínimos, amplitude e média por grupo e para a totalidade dos 18 implantes.

ANEXOS

Caracterização dos implantes constituintes dos seis grupos(a)

		P 2p	Ca 2p	Ti 2p (2 p1 + 2p3)	Pb 4f (4f5 + 4f7)	
Grupo	Maquinado I	1	,0023	,0011	,0658	,0003
		2	,0019	,0017	,0917	,0007
		3	,0021	,0015	,0945	,0007
	Total	N	3	3	3	3
		Minimum	,0019	,0011	,0658	,0003
		Maximum	,0023	,0017	,0945	,0007
		Range	,0004	,0006	,0287	,0004
		Mean	,002100	,001433	,084000	,000567
	Maquinado II	1	,0066	,0035	,0960	,0008
			2	,0071	,0041	,1250
3			,0066	,0032	,1170	,0009
Total		N	3	3	3	3
		Minimum	,0066	,0032	,0960	,0008
		Maximum	,0071	,0041	,1250	,0009
		Range	,0005	,0009	,0290	,0001
		Mean	,006767	,003600	,112667	,000867
Jacteamto com ataque ácido I		1	,0015	,0054	,1376	,0000
			2	,0020	,0061	,1260
	3		,0034	,0043	,1029	,0000
	Total	N	3	3	3	3
		Minimum	,0015	,0043	,1029	,0000
		Maximum	,0034	,0061	,1376	,0000
		Range	,0019	,0018	,0347	,0000
		Mean	,002300	,005267	,122167	,000000
	Jacteamto com ataque ácido II	1	,0058	,0021	,0825	,0000
			2	,0044	,0016	,0902
3			,0047	,0015	,0758	,0000
Total		N	3	3	3	3
		Minimum	,0044	,0015	,0758	,0000
		Maximum	,0058	,0021	,0902	,0000
		Range	,0014	,0006	,0144	,0000
		Mean	,004967	,001733	,082833	,000000

ANEXOS

Caracterização dos implantes constituintes dos seis grupos(a)

		P 2p	Ca 2p	Ti 2p (2 p1 + 2p3)	Pb 4f (4f5 + 4f7)	
Jacteamento com ataque ácido III	1	,0020	,0044	,0823	,0000	
	2	,0018	,0049	,0982	,0000	
	3	,0017	,0074	,0612	,0000	
	Total	N	3	3	3	3
		Minimum	,0017	,0044	,0612	,0000
		Maximum	,0020	,0074	,0982	,0000
		Range	,0003	,0030	,0370	,0000
	Mean	,001833	,005567	,080567	,000000	
Plasma	1	,0143	,0029	,2161	,0000	
	2	,0105	,0031	,1705	,0000	
	3	,0100	,0019	,1758	,0000	
	Total	N	3	3	3	3
		Minimum	,0100	,0019	,1705	,0000
		Maximum	,0143	,0031	,2161	,0000
		Range	,0043	,0012	,0456	,0000
	Mean	,011600	,002633	,187467	,000000	
Total	N	18	18	18	18	
	Minimum	,0015	,0011	,0612	,0000	
	Maximum	,0143	,0074	,2161	,0009	
	Range	,0128	,0063	,1549	,0009	
	Mean	,004928	,003372	,111617	,000239	

Caracterização dos implantes constituintes dos seis grupos

a Limited to first 100 cases.

Anexo 4 – Percentagem atômica dos elementos fósforo, cálcio, titânio e chumbo obtida para cada implante analisado.
Valores máximos, mínimos, amplitude e média por grupo e para a totalidade dos 18 implantes.

ANEXOS

ANEXO 9 – Estatística descritiva das concentrações dos elementos químicos analisados

Estatística descritiva

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
C 1s	18	,179	,689	,45014	,113916
N 1s	18	,013	,034	,02251	,006405
O 1s	18	,213	,537	,36218	,073718
F 1s	18	,000	,009	,00441	,002103
Al 2p	18	,004	,060	,02826	,018100
Si 2p	18	,006	,035	,01236	,006750
P 2p	18	,002	,014	,00493	,003690
Ca 2p	18	,001	,007	,00337	,001795
Ti 2p (2 p1 + 2p3)	18	,061	,216	,11162	,041212
Pb 4f (4f5 + 4f7)	18	,000	,001	,00024	,000368
Valid N (listwise)	18				

Composição química, por elemento, considerando o valor máximo, o valor mínimo, a média e o desvio-padrão, obtidos, considerando o universo total dos 18 implantes analisados

Estatística descritiva

	N		Mean	
	Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error
C 1s	18		,45014	,02685
N 1s	18		,02251	,00151
O 1s	18		,36218	,01738
F 1s	18		,00441	,00050
Al 2p	18		,02826	,00427
Si 2p	18		,01236	,00159
P 2p	18		,00493	,00087
Ca 2p	18		,00337	,00042
Ti 2p (2 p1 + 2p3)	18		,11162	,00971
Pb 4f (4f5 + 4f7)	18		,00024	,00009
Valid N (listwise)	18			

ANEXOS

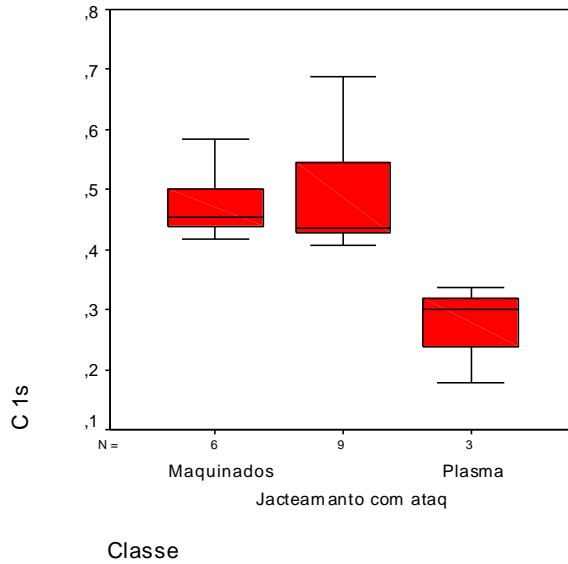
ANEXO 10 – Estatística descritiva da concentração dos elementos químicos analisados, por classes (Maquinados - n=6; Jacteamanto e ataque ácido – n=9; Plasma – n=3)

Descriptives						
C 1s	Classe			Statistic	Std. Error	
	Maquinados	Mean		,474933	,0244530	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,412075		
			Upper Bound	,537792		
		5% Trimmed Mean		,472065		
		Median		,453700		
		Variance		,004		
		Std. Deviation		,0598974		
		Minimum		,4180		
		Maximum		,5835		
		Range		,1655		
		Interquartile Range		,088400		
		Skewness		1,464	,845	
		Kurtosis		2,018	1,741	
		Jacteamanto com ataque ácido	Mean		,493189	,0318075
			95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,419841	
				Upper Bound	,566537	
	5% Trimmed Mean			,487027		
	Median			,434900		
	Variance			,009		
	Std. Deviation			,0954226		
	Minimum			,4082		
	Maximum			,6891		
	Range			,2809		
	Interquartile Range			,138650		
	Skewness			1,257	,717	
	Kurtosis			,819	1,400	
	Plasma		Mean		,271400	,0476301
			95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,066464	
				Upper Bound	,476336	
		5% Trimmed Mean		.		
		Median		,299600		
		Variance		,007		
		Std. Deviation		,0824977		
		Minimum		,1785		
		Maximum		,3361		
		Range		,1576		
		Interquartile Range		.		
		Skewness		-1,358	1,225	
		Kurtosis		.	.	

ANEXOS

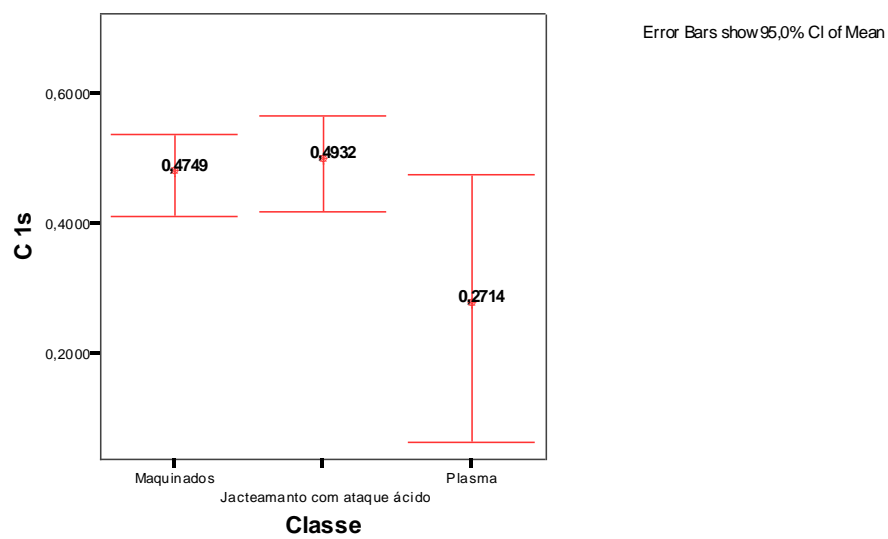
Gráfico de extremos e quartis das classes maquinados, jacteados e plasma, para o elemento químico carbono

C 1s



Estimativa de concentração de C 1s

Intervalos de confiança (0,95)



Error Bars show 95,0% CI of Mean

ANEXOS

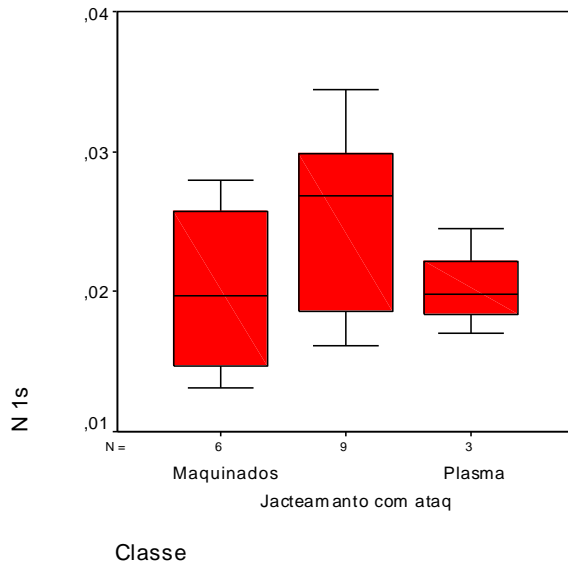
Classe

		Descriptives			
N 1s	Classe			Statistic	Std. Error
N 1s	Maquinados	Mean		,020133	,0026149
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,013411	
			Upper Bound	,026855	
		5% Trimmed Mean		,020087	
		Median		,019650	
		Variance		,000	
		Std. Deviation		,0064052	
		Minimum		,0131	
		Maximum		,0280	
		Range		,0149	
		Interquartile Range		,011975	
		Skewness		,118	,845
		Kurtosis		-2,635	1,741
	Jacteamanto com ataque ácido	Mean		,024789	,0022669
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,019561	
			Upper Bound	,030016	
		5% Trimmed Mean		,024738	
		Median		,026800	
		Variance		,000	
		Std. Deviation		,0068006	
Minimum			,0161		
Maximum			,0344		
Range			,0183		
Interquartile Range			,012650		
Skewness			-,034	,717	
Kurtosis			-1,807	1,400	
Plasma	Mean		,020433	,0021881	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,011019		
		Upper Bound	,029848		
	5% Trimmed Mean		,		
	Median		,019800		
	Variance		,000		
	Std. Deviation		,0037899		
	Minimum		,0170		
	Maximum		,0245		
	Range		,0075		
	Interquartile Range		,		
	Skewness		,731	1,225	
	Kurtosis		,		

ANEXOS

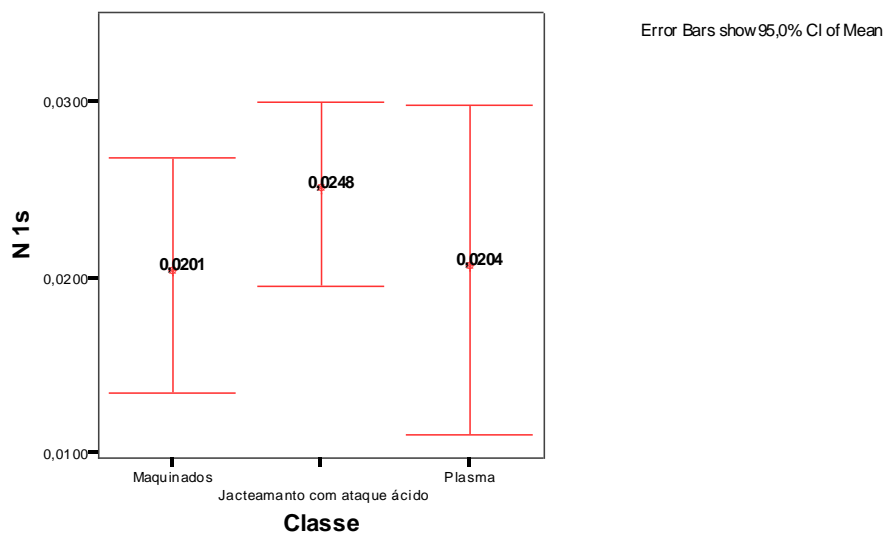
Gráfico de extremos e quartis das classes maquinado, jateados e plasma, para o elemento químico azoto

N 1s



Estimativa de concentração de N 1s

Intervalos de confiança (0,95)



Error Bars show 95,0% CI of Mean

ANEXOS

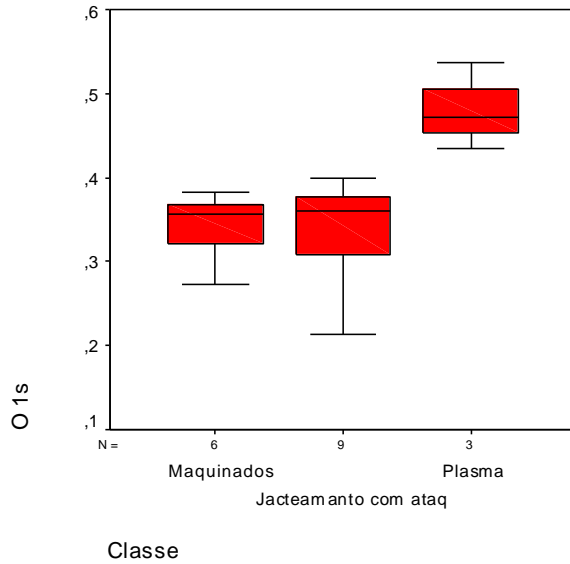
Classe

		Descriptives			
O 1s	Classe			Statistic	Std. Error
	Maquinados	Mean		,342467	,0162517
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,300690	
			Upper Bound	,384243	
		5% Trimmed Mean		,344202	
		Median		,355800	
		Variance		,002	
		Std. Deviation		,0398084	
		Minimum		,2721	
		Maximum		,3816	
		Range		,1095	
		Interquartile Range		,061650	
		Skewness		-1,309	,845
		Kurtosis		1,425	1,741
		Jacteamanto com ataque ácido	Mean		,335622
	95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	,290229	
			Upper Bound	,381015	
	5% Trimmed Mean			,338852	
	Median			,361000	
	Variance			,003	
	Std. Deviation			,0590537	
	Minimum			,2132	
	Maximum			,3999	
	Range			,1867	
	Interquartile Range			,081800	
	Skewness			-1,212	,717
	Kurtosis			1,116	1,400
	Plasma		Mean		,481300
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,353270	
			Upper Bound	,609330	
		5% Trimmed Mean		,	
		Median		,471600	
		Variance		,003	
		Std. Deviation		,0515392	
		Minimum		,4353	
		Maximum		,5370	
		Range		,1017	
		Interquartile Range		,	
		Skewness		,817	1,225
		Kurtosis		,	

ANEXOS

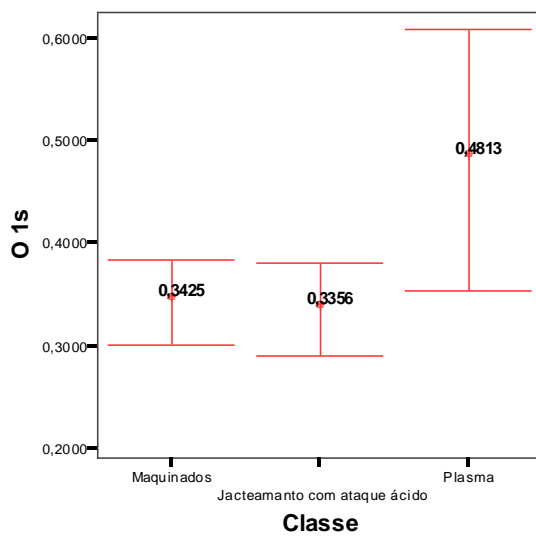
Gráfico de extremos e quartis das classes maquinado, jateados e plasma, para o elemento químico oxigênio

O 1s



Estimativa de concentração de O 1s

Intervalos de confiança (0,95)



Error Bars show 95,0% CI of Mean

ANEXOS

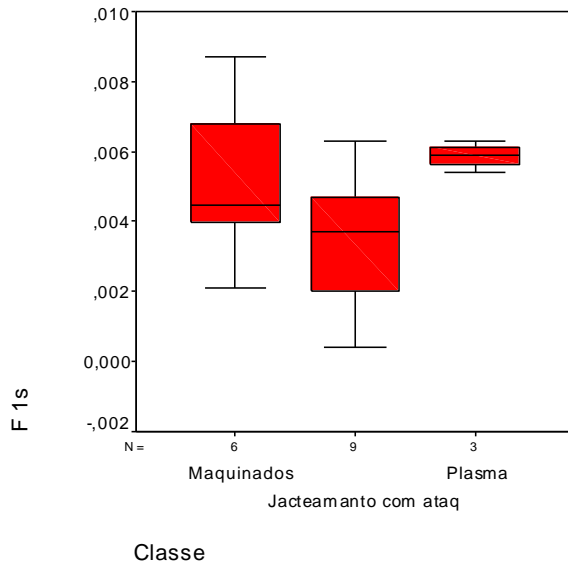
Classe

		Descriptives			
F 1s	Classe			Statistic	Std. Error
	Maquinados	Mean		,005083	,0009492
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,002643	
			Upper Bound	,007523	
		5% Trimmed Mean		,005048	
		Median		,004450	
		Variance		,000	
		Std. Deviation		,0023250	
		Minimum		,0021	
		Maximum		,0087	
		Range		,0066	
		Interquartile Range		,003750	
		Skewness		,568	,845
		Kurtosis		,002	1,741
		Jacteamanto com ataque ácido	Mean		,003478
	95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	,001969	
			Upper Bound	,004986	
	5% Trimmed Mean			,003492	
	Median			,003700	
	Variance			,000	
	Std. Deviation			,0019626	
	Minimum			,0004	
	Maximum			,0063	
	Range			,0059	
	Interquartile Range			,003350	
	Skewness			-,147	,717
	Kurtosis			-1,075	1,400
	Plasma		Mean		,005867
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,004747	
			Upper Bound	,006987	
		5% Trimmed Mean		.	
		Median		,005900	
		Variance		,000	
		Std. Deviation		,0004509	
		Minimum		,0054	
		Maximum		,0063	
		Range		,0009	
		Interquartile Range		.	
		Skewness		-,331	1,225
		Kurtosis		.	

ANEXOS

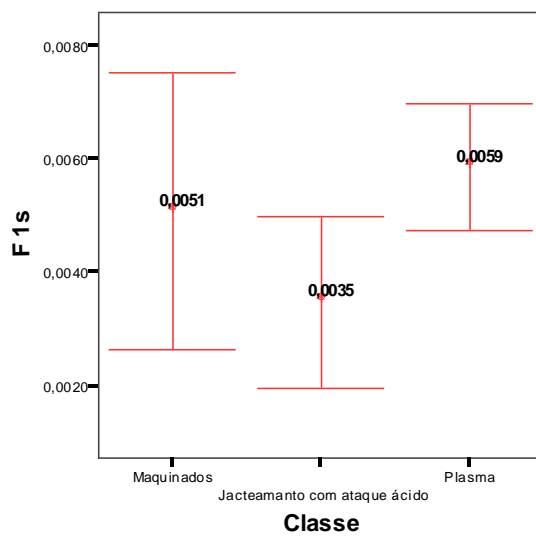
Gráfico de extremos e quartis das classes maquinado, jacteados e plasma, para o elemento químico flúor

F 1s



Estimativa de concentração de F 1s

Intervalos de confiança (0,95)



Error Bars show 95,0% CI of Mean

ANEXOS

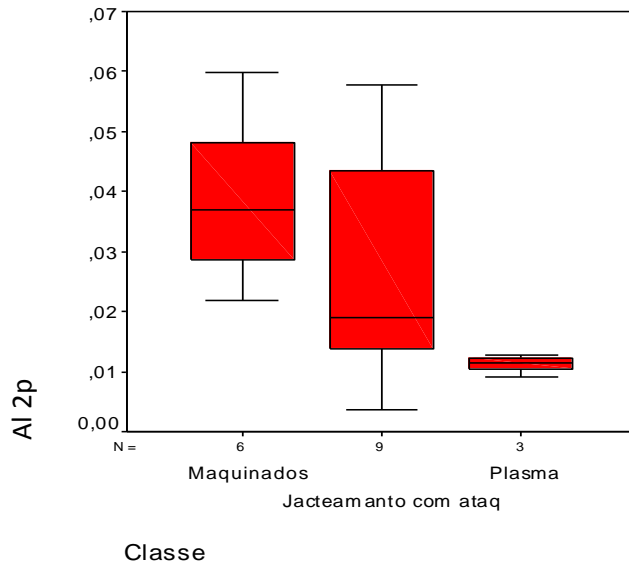
Classe

		Descriptives			
Classe	Classe			Statistic	Std. Error
Al 2p	Maquinados	Mean		,038733	,0059051
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,023554	
			Upper Bound	,053913	
		5% Trimmed Mean		,038493	
		Median		,036950	
		Variance		,000	
		Std. Deviation		,0144644	
		Minimum		,0219	
		Maximum		,0599	
		Range		,0380	
	Interquartile Range		,024275		
	Skewness		,384	,845	
	Kurtosis		-1,313	1,741	
	Jacteamanto com ataque ácido	Mean		,026978	,0064151
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,012184	
			Upper Bound	,041771	
		5% Trimmed Mean		,026559	
		Median		,018900	
		Variance		,000	
		Std. Deviation		,0192454	
Minimum			,0037		
Maximum			,0578		
Range			,0541		
Interquartile Range		,034650			
Skewness		,713	,717		
Kurtosis		-1,095	1,400		
Plasma	Mean		,011133	,0010837	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,006470		
		Upper Bound	,015796		
	5% Trimmed Mean		.		
	Median		,011500		
	Variance		,000		
	Std. Deviation		,0018771		
	Minimum		,0091		
	Maximum		,0128		
	Range		,0037		
Interquartile Range		.			
Skewness		-,845	1,225		
Kurtosis		.			

ANEXOS

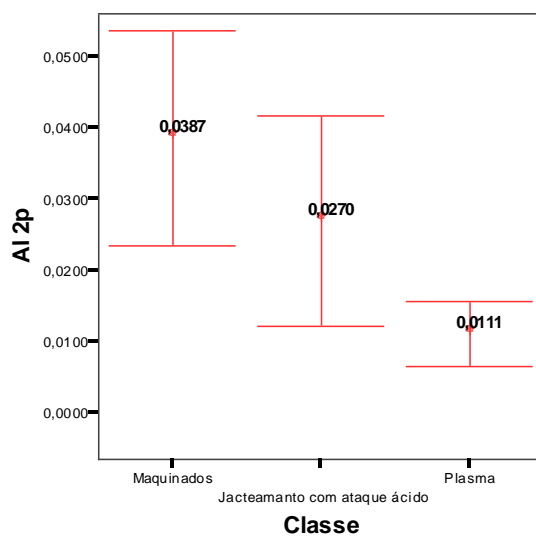
Gráfico de extremos e quartis das classes maquinado, jateados e plasma, para o elemento químico Alumínio

Al 2p



Estimativa de concentração de Al 2p

Intervalos de confiança (0,95)



Error Bars show 95,0% CI of Mean

ANEXOS

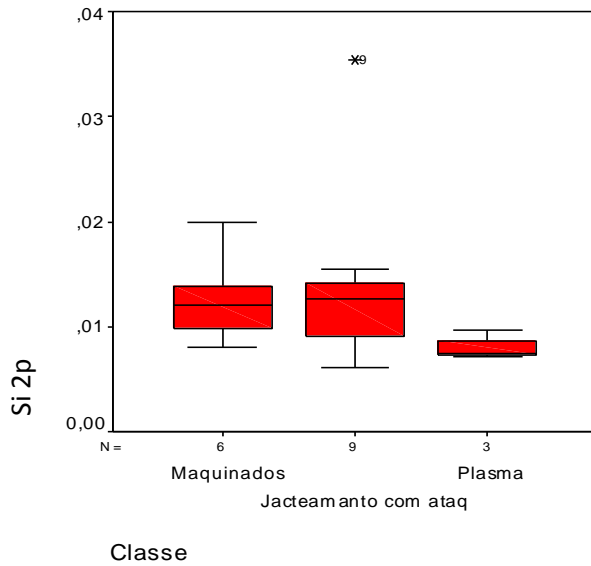
Classe

		Descriptives			
Classe	Classe			Statistic	Std. Error
Si 2p	Maquinados	Mean		,012633	,0017194
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,008213	
			Upper Bound	,017053	
		5% Trimmed Mean		,012481	
		Median		,012050	
		Variance		,000	
		Std. Deviation		,0042117	
		Minimum		,0080	
		Maximum		,0200	
		Range		,0120	
		Interquartile Range		,006075	
		Skewness		1,103	,845
		Kurtosis		1,496	1,741
		Jacteamanto com ataque ácido	Mean		,013589
	95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	,006852	
			Upper Bound	,020326	
	5% Trimmed Mean			,012793	
	Median			,012600	
	Variance			,000	
	Std. Deviation			,0087642	
	Minimum			,0061	
Maximum			,0354		
Range			,0293		
Interquartile Range			,006600		
Skewness			2,278	,717	
Kurtosis			5,953	1,400	
Plasma	Mean			,008133	,0007881
	95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	,004742	
			Upper Bound	,011524	
	5% Trimmed Mean			.	
	Median		,007500		
	Variance		,000		
	Std. Deviation		,0013650		
	Minimum		,0072		
	Maximum		,0097		
	Range		,0025		
	Interquartile Range		.		
	Skewness		1,638	1,225	
	Kurtosis		.		

ANEXOS

Gráfico de extremos e quartis das classes maquinado, jateados e plasma, para o elemento químico silício

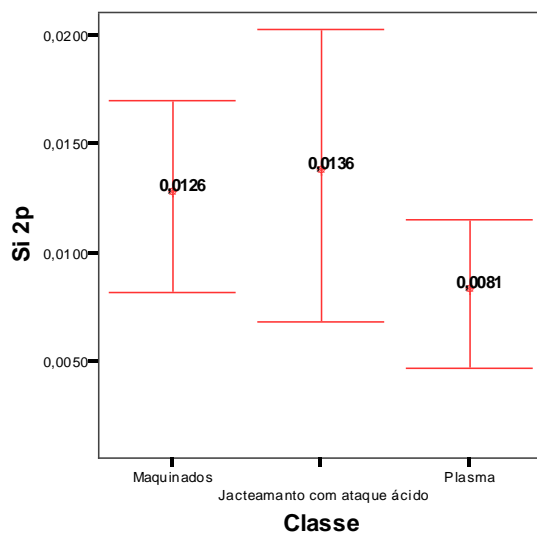
Si 2p



Interactive Graph

Estimativa de concentração de Si 2p

Intervalos de confiança (0,95)



Error Bars show 95,0% CI of Mean

ANEXOS

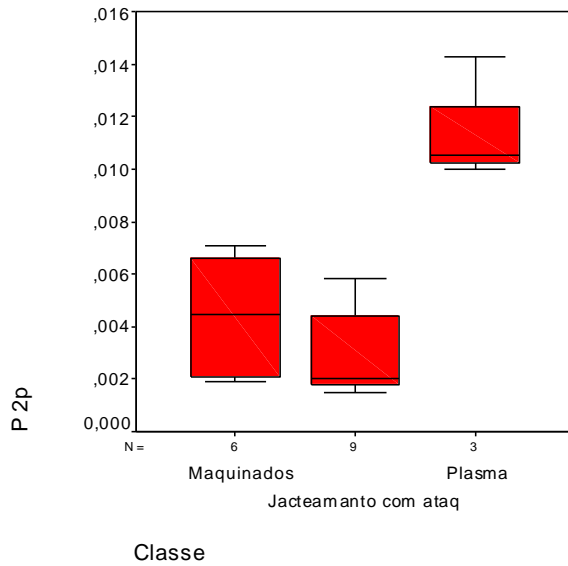
Classe

		Descriptives				
	Classe			Statistic	Std. Error	
P 2p	Maquinados	Mean		,004433	,0010474	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,001741		
			Upper Bound	,007126		
		5% Trimmed Mean		,004426		
		Median		,004450		
		Variance		,000		
		Std. Deviation		,0025657		
		Minimum		,0019		
		Maximum		,0071		
		Range		,0052		
		Interquartile Range		,004675		
		Skewness		,011	,845	
		Kurtosis		-3,242	1,741	
		Jacteamanto com ataque ácido	Mean		,003033	,0005299
			95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,001811	
	Upper Bound			,004255		
	5% Trimmed Mean			,002965		
	Median			,002000		
	Variance			,000		
	Std. Deviation			,0015898		
	Minimum			,0015		
	Maximum			,0058		
	Range			,0043		
	Interquartile Range			,002800		
	Skewness			,734	,717	
	Kurtosis			-1,087	1,400	
	Plasma		Mean		,011600	,0013577
			95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,005758	
		Upper Bound		,017442		
		5% Trimmed Mean		.		
		Median		,010500		
		Variance		,000		
		Std. Deviation		,0023516		
Minimum			,0100			
Maximum			,0143			
Range			,0043			
Interquartile Range			.			
Skewness			1,644	1,225		
Kurtosis			.	.		

ANEXOS

Gráfico de extremos e quartis das classes maquinado, jacteados e plasma, para o elemento químico fósforo

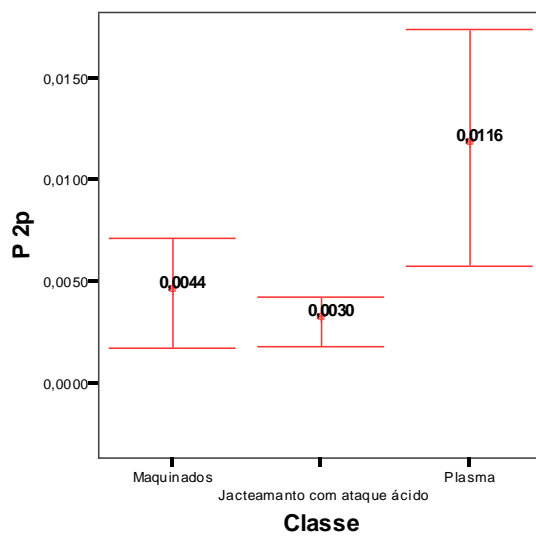
P 2p



Interactive Graph

Estimativa de concentração de P 2p

Intervalos de confiança (0,95)



Error Bars show 95,0% CI of Mean

ANEXOS

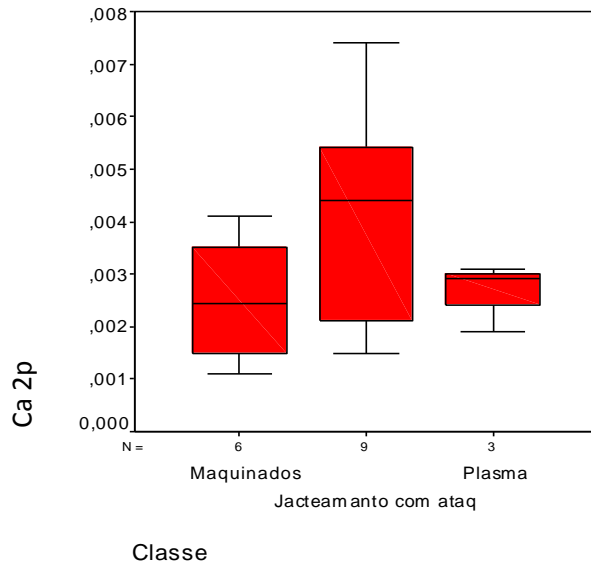
Classe

		Descriptives			
Ca 2p	Classe			Statistic	Std. Error
	Maquinados	Mean		,002517	,0005049
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,001219	
			Upper Bound	,003815	
		5% Trimmed Mean		,002507	
		Median		,002450	
		Variance		,000	
		Std. Deviation		,0012368	
		Minimum		,0011	
		Maximum		,0041	
		Range		,0030	
		Interquartile Range		,002250	
		Skewness		,127	,845
		Kurtosis		-2,367	1,741
		Jacteamanto com ataque ácido	Mean		,004189
	95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	,002598	
			Upper Bound	,005780	
	5% Trimmed Mean			,004160	
	Median			,004400	
	Variance			,000	
	Std. Deviation			,0020703	
	Minimum			,0015	
	Maximum			,0074	
	Range			,0059	
	Interquartile Range			,003900	
	Skewness			-,066	,717
	Kurtosis			-1,097	1,400
	Plasma		Mean		,002633
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,001036	
			Upper Bound	,004230	
		5% Trimmed Mean		.	
		Median		,002900	
		Variance		,000	
		Std. Deviation		,0006429	
		Minimum		,0019	
		Maximum		,0031	
		Range		,0012	
		Interquartile Range		.	
		Skewness		-1,545	1,225
		Kurtosis		.	.

ANEXOS

Gráfico de extremos e quartis das classes maquinado, jateados e plasma, para o elemento químico cálcio

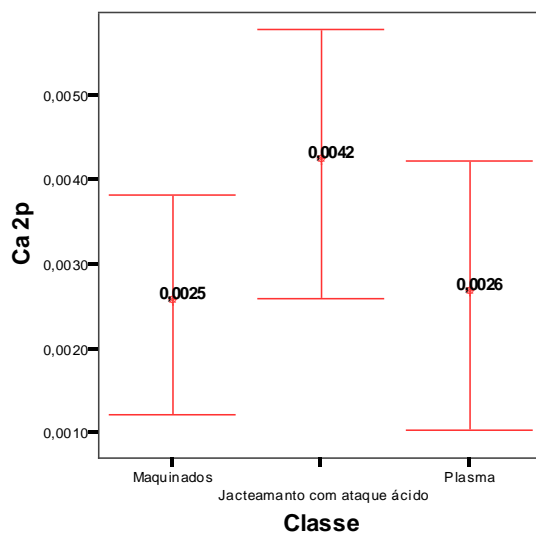
Ca 2p



Interactive Graph

Estimativa de concentração de Ca 2p

Intervalos de confiança (0,95)



Error Bars show 95,0% CI of Mean

ANEXOS

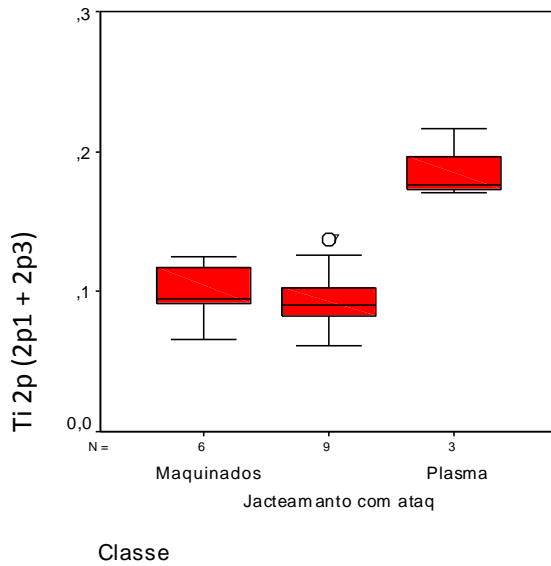
Classe

		Descriptives			
Ti 2p (2 p1 + 2p3)	Classe			Statistic	Std. Error
	Maquinados	Mean		,098333	,0085286
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,076410	
			Upper Bound	,120257	
		5% Trimmed Mean		,098659	
		Median		,095250	
		Variance		,000	
		Std. Deviation		,0208907	
		Minimum		,0658	
		Maximum		,1250	
		Range		,0592	
		Interquartile Range		,033775	
		Skewness		-,307	,845
		Kurtosis		,180	1,741
	Jacteamanto com ataque ácido	Mean		,095189	,0080793
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,076558	
			Upper Bound	,113820	
		5% Trimmed Mean		,094721	
		Median		,090200	
		Variance		,001	
		Std. Deviation		,0242378	
		Minimum		,0612	
		Maximum		,1376	
		Range		,0764	
		Interquartile Range		,035400	
		Skewness		,623	,717
		Kurtosis		-,171	1,400
	Plasma	Mean		,187467	,0143982
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,125516	
			Upper Bound	,249417	
		5% Trimmed Mean		.	
		Median		,175800	
		Variance		,001	
		Std. Deviation		,0249384	
		Minimum		,1705	
		Maximum		,2161	
		Range		,0456	
		Interquartile Range		.	
		Skewness		1,644	1,225
		Kurtosis		.	.

ANEXOS

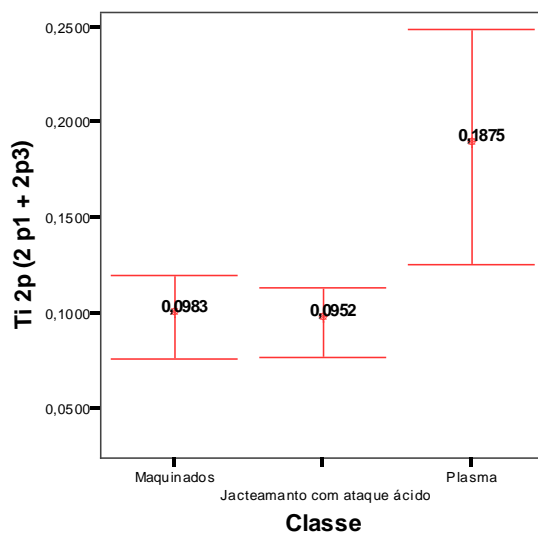
Gráfico de extremos e quartis das classes maquinado, jateados e plasma, para o elemento químico titânio

Ti 2p (2 p1 + 2p3)



Estimativa de concentração de Ti 2p

Intervalos de confiança (0,95)



Error Bars show 95,0% CI of Mean

ANEXOS

Classe

		Descriptives(a,b)				
Pb 4f (4f5 + 4f7)	Classe			Statistic	Std. Error	
	Maquinados	Mean		,000717	,0000910	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,000483		
			Upper Bound		,000951	
		5% Trimmed Mean		,000730		
		Median		,000750		
		Variance		,000		
		Std. Deviation		,0002229		
		Minimum		,0003		
		Maximum		,0009		
		Range		,0006		
		Interquartile Range		,000300		
		Skewness		-1,611	,845	
		Kurtosis		2,958	1,741	
		Jacteamanto com ataque ácido	Mean			
	95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound			
			Upper Bound			
	5% Trimmed Mean					
	Median					
	Variance					
	Std. Deviation					
	Minimum					
	Maximum					
	Range					
	Interquartile Range					
	Skewness					
	Kurtosis					
	Plasma		Mean			
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound				
		Upper Bound				
5% Trimmed Mean						
Median						
Variance						
Std. Deviation						
Minimum						
Maximum						
Range						
Interquartile Range						
Skewness						
Kurtosis						

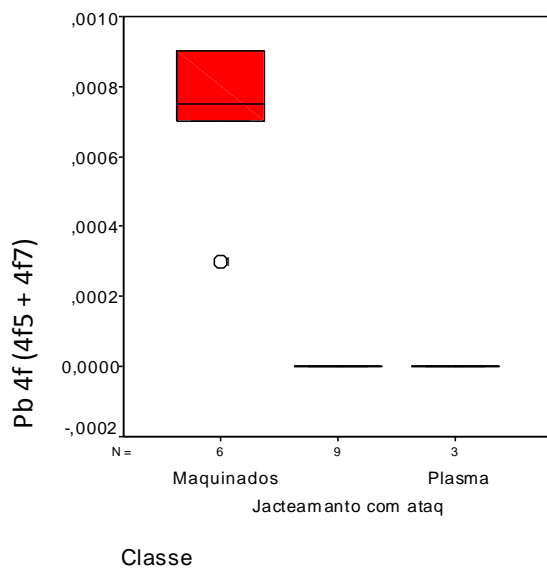
a Pb 4f (4f5 + 4f7) is constant when Classe = Jacteamanto com ataque ácido. It has been omitted.

b Pb 4f (4f5 + 4f7) is constant when Classe = Plasma. It has been omitted.

ANEXOS

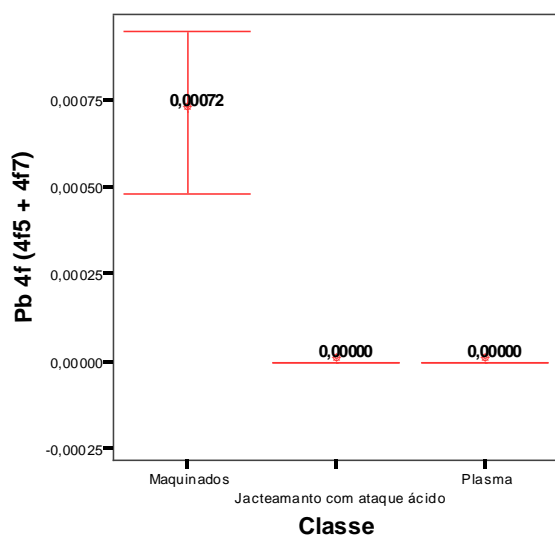
Gráfico de extremos e quartis das classes maquinado, jateados e plasma, para o elemento químico chumbo

Pb 4f (4f5 + 4f7)



Estimativa de concentração de Pb 4f

Intervalos de confiança (0,95)



Error Bars show 95,0% CI of Mean

ANEXOS

ANEXO 11 – Comparação das concentrações medias dos elementos C, O, P, Ti e Pb, inter-classes

NPar Tests Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Classe	N	Mean Rank
C 1s	Maquinados	6	11,33
	Jacteamanto com ataque ácido	9	10,78
	Plasma	3	2,00
	Total	18	
O 1s	Maquinados	6	7,67
	Jacteamanto com ataque ácido	9	8,22
	Plasma	3	17,00
	Total	18	
P 2p	Maquinados	6	10,17
	Jacteamanto com ataque ácido	9	6,56
	Plasma	3	17,00
	Total	18	
Ti 2p (2 p1 + 2p3)	Maquinados	6	8,50
	Jacteamanto com ataque ácido	9	7,67
	Plasma	3	17,00
	Total	18	
Pb 4f (4f5 + 4f7)	Maquinados	6	15,50
	Jacteamanto com ataque ácido	9	6,50
	Plasma	3	6,50
	Total	18	

Test Statistics(a,b)					
	C 1s	O 1s	P 2p	Ti 2p (2 p1 + 2p3)	Pb 4f (4f5 + 4f7)
Chi-Square	7,144	7,144	8,771	7,193	16,176
df	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	,028	,028	,012	,027	,000
Exact Sig.	,018	,018	,005	,017	,000
Point Probability	,000	,000	,000	,001	,000

a. Kruskal Wallis Test
b. Grouping Variable: Classe

ANEXOS

ANEXO 12 – Comparação das concentrações medias dos elementos C, O, P, Ti e Pb, intra-classes

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Classe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
C 1s	Maquinados	6	8,33	50,00
	Jacteamanto com ataque ácido	9	7,78	70,00
	Total	15		

Test Statistics(b)

	C 1s
Mann-Whitney U	25,000
Wilcoxon W	70,000
Z	-,236
Asymp. Sig. (2-tailed)	,814
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,864(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,864
Exact Sig. (1-tailed)	,432
Point Probability	,044

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Classe

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Classe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
C 1s	Maquinados	6	6,50	39,00
	Plasma	3	2,00	6,00
	Total	9		

Test Statistics(b)

	C 1s
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	6,000
Z	-2,324
Asymp. Sig. (2-tailed)	,020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,024(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,024
Exact Sig. (1-tailed)	,012
Point Probability	,012

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Classe

ANEXOS

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Classe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
C 1s	Jacteamanto com ataque ácido	9	8,00	72,00
	Plasma	3	2,00	6,00
	Total	12		

Test Statistics(b)

	C 1s
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	6,000
Z	-2,496
Asymp. Sig. (2-tailed)	,013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,009(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. (1-tailed)	,005
Point Probability	,005

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Classe

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Classe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
O 1s	Maquinados	6	7,67	46,00
	Jacteamanto com ataque ácido	9	8,22	74,00
	Total	15		

Test Statistics(b)

	O 1s
Mann-Whitney U	25,000
Wilcoxon W	46,000
Z	-,236
Asymp. Sig. (2-tailed)	,814
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,864(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,864
Exact Sig. (1-tailed)	,432
Point Probability	,044

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Classe

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Classe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
O 1s	Maquinados	6	3,50	21,00
	Plasma	3	8,00	24,00
	Total	9		

Test Statistics(b)

	O 1s
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	21,000
Z	-2,324
Asymp. Sig. (2-tailed)	,020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,024(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,024
Exact Sig. (1-tailed)	,012
Point Probability	,012

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Classe

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Classe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
O 1s	Jacteamanto com ataque ácido	9	5,00	45,00
	Plasma	3	11,00	33,00
	Total	12		

Test Statistics(b)

	O 1s
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-2,496
Asymp. Sig. (2-tailed)	,013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,009(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. (1-tailed)	,005
Point Probability	,005

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Classe

ANEXOS

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Classe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ti 2p (2 p1 + 2p3)	Maquinados	6	8,50	51,00
	Jacteamanto com ataque ácido	9	7,67	69,00
	Total	15		

Test Statistics(b)

	Ti 2p (2 p1 + 2p3)
Mann-Whitney U	24,000
Wilcoxon W	69,000
Z	-,354
Asymp. Sig. (2-tailed)	,724
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,776(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,776
Exact Sig. (1-tailed)	,388
Point Probability	,043

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Classe

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Classe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ti 2p (2 p1 + 2p3)	Maquinados	6	3,50	21,00
	Plasma	3	8,00	24,00
	Total	9		

Test Statistics(b)

	Ti 2p (2 p1 + 2p3)
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	21,000
Z	-2,324
Asymp. Sig. (2-tailed)	,020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,024(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,024
Exact Sig. (1-tailed)	,012
Point Probability	,012

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Classe

ANEXOS

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Classe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ti 2p (2 p1 + 2p3)	Jacteamanto com ataque ácido	9	5,00	45,00
	Plasma	3	11,00	33,00
	Total	12		

Test Statistics(b)

	Ti 2p (2 p1 + 2p3)
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-2,496
Asymp. Sig. (2-tailed)	,013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,009(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. (1-tailed)	,005
Point Probability	,005

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Classe

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Classe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
P 2p	Maquinados	6	10,17	61,00
	Jacteamanto com ataque ácido	9	6,56	59,00
	Total	15		

Test Statistics(b)

	P 2p
Mann-Whitney U	14,000
Wilcoxon W	59,000
Z	-1,535
Asymp. Sig. (2-tailed)	,125
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,145(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,136
Exact Sig. (1-tailed)	,068
Point Probability	,008

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Classe

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Classe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
P 2p	Maquinados	6	3,50	21,00
	Plasma	3	8,00	24,00
	Total	9		

Test Statistics(b)	
	P 2p
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	21,000
Z	-2,334
Asymp. Sig. (2-tailed)	,020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,024(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,024
Exact Sig. (1-tailed)	,012
Point Probability	,012

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Classe

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Classe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
P 2p	Jacteamanto com ataque ácido	9	5,00	45,00
	Plasma	3	11,00	33,00
	Total	12		

Test Statistics(b)	
	P 2p
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-2,501
Asymp. Sig. (2-tailed)	,012
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,009(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. (1-tailed)	,005
Point Probability	,005

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Classe

ANEXOS

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Classe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Pb 4f (4f5 + 4f7)	Maquinados	6	12,50	75,00
	Jacteamanto com ataque ácido	9	5,00	45,00
	Total	15		

Test Statistics(b)

	Pb 4f (4f5 + 4f7)
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,598
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Classe

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Classe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Pb 4f (4f5 + 4f7)	Maquinados	6	6,50	39,00
	Plasma	3	2,00	6,00
	Total	9		

Test Statistics(b)

	Pb 4f (4f5 + 4f7)
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	6,000
Z	-2,384
Asymp. Sig. (2-tailed)	,017
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,024(a)
Exact Sig. (2-tailed)	,024
Exact Sig. (1-tailed)	,012
Point Probability	,012

a Not corrected for ties.
b Grouping Variable: Classe

ANEXOS

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks				
	Classe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Pb 4f (4f5 + 4f7)	Jacteamanto com ataque ácido	9	6,50	58,50
	Plasma	3	6,50	19,50
	Total	12		

Test Statistics(b)	
	Pb 4f (4f5 + 4f7)
Mann-Whitney U	13,500
Wilcoxon W	19,500
Z	,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000(a)
Exact Sig. (2-tailed)	1,000
Exact Sig. (1-tailed)	1,000
Point Probability	1,000

a. Not corrected for ties.
b. Grouping Variable: Classe