

CRESCIMENTO CELULAR EM SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

Lidiane Sartini de Oliveira, lidiane@icte.uftm.edu.br
Cleudmar Amaral de Araújo, cleudmar@mecanica.ufu.br
Gustavo Mendonça, gustavomendonsa@gmail.com
Daniela Bacelli Silveira Mendonça, daniela_mendonca@dentistry.unc.edu

Resumo: Na década de 60, Brånemark e colaboradores, fundamentados em pesquisas clínicas, desenvolveram um novo sistema de implantes dentários que possuía uma ancoragem direta no tecido ósseo, sem a interposição de tecido mole. Este fenômeno denominado de osseointegração envolve aspectos biomecânicos e ainda não foi completamente esclarecido. Em vários estudos tem-se verificado que o tratamento da superfície do implante, por exemplo, superfícies tratadas com jateamento e condicionadas com ataque ácido, vêm sendo um dos principais fatores que influenciam na osteogênese e, conseqüentemente, na osseointegração. Tais superfícies apresentariam condições apropriadas para uma aposição óssea de forma mais rápida possibilitando uma aplicação de carga em um menor período de tempo. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes superfícies obtidas por diferentes condições de jateamento e ataque ácido (18 condições de tratamento superficial – G01 a G18) no crescimento celular sobre discos de titânio. A avaliação foi feita utilizando ensaios “in vitro” de cultura de células osteoblásticas Hfob 1.19 através das medidas da proliferação e viabilidade celular, fosfatase alcalina e nódulos de mineralização, que foram comparados com os níveis de rugosidade média nos diferentes grupos. Foi observado que estes parâmetros osteogênicos sofreram influência do tratamento superficial alterando o crescimento celular. Neste caso, foi observada uma maior alteração no grupo G04 (Granulometria: 240, tempo: 3 s distância: 10 cm, pressão: 20 bar, ácido em temperatura ambiente por 30') e uma menor alteração no grupo G07 (Granulometria: 280, tempo: 3 s, distancia: 10 cm, pressão: 20 bar, ácido em temperatura de 60 °C por 30'). De acordo com análise estatística foi observado que em relação à rugosidade média, estes dois grupos foram estatisticamente diferentes ($P < 0,01$), o que pode justificar as alterações no crescimento celular.

Palavras-Chave: Osseointegração, osteogênese, implantes dentários, rugosidade, titânio.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente as indústrias de implantes médicos e odontológicos procuram desenvolver seus produtos baseados em avanços da bioengenharia tecidual relacionados com a biologia celular e molecular. Enquanto no passado a maioria dos implantes eram inertes e essencialmente estruturais, os produtos atuais buscam implantes essencialmente biológicos em sua natureza, de tal forma a favorecer o processo de reparo inerente ao organismo, além de aumentar a sua sobrevida. Além disso, uma variedade de dispositivos utilizados na implantologia tem sido explorada a fim de acelerar a velocidade do reparo ósseo, a qualidade e a quantidade de osso neoformado, além de diminuir a osteólise periprotética e o conseqüente afrouxamento de implantes (PUELO e NANJI, 1999; DAVIES, 2003; SCHMIDT et al., 2003).

O sucesso da terapia com implantes é confirmada através da obtenção de um contato direto entre a superfície do implante e o tecido ósseo neo-formado. Esse fenômeno, denominado osseointegração, ocorre após uma inflamação inicial durante a instalação do implante, seguida por alterações no micro-ambiente peri-implantar que conduzem à neo-formação óssea na superfície do implante. Clinicamente, o fenômeno de osseointegração é caracterizado pela imobilidade do implante e ausência de sintomatologia durante a função mastigatória (BRANEMARK, 1985).

Os principais mecanismos relacionados ao processo de osseointegração dos implantes são similares aos que ocorrem durante o reparo de uma fratura óssea, e envolvem uma série de eventos celulares e moleculares (DAVIES, 2003; FRANCHI et al., 2005). Existem evidências crescentes de que algumas ações, como o crescimento celular, dependem de um estágio de diferenciação (WATZEK, 2004).

Portanto, apesar do êxito nas aplicações que envolvem o fenômeno da osseointegração ao longo destes últimos 20 anos ainda existem diversas investigações que buscam obter melhores respostas a curto e a longo prazo. Por isso é necessário um amplo conhecimento das propriedades físico-químicas e topográficas da superfície do material, permitindo o desenvolvimento de novas geometrias com a otimização da resposta tecidual (BÁDENAS, 2004). Além disso, sabe-se que os osteoblastos, células responsáveis pela produção da matriz óssea, respondem a variações na rugosidade e energia superficial dos implantes. Neste caso, testes de cultura de células podem avaliar o efeito do material sobre as células no que se refere à multiplicação, função, toxicidade e adesão. Nestes testes analisa-se como células mantidas em cultura, interagem com as superfícies.

O objetivo deste trabalho é avaliar os níveis de osteogênese em diferentes superfícies de titânio utilizando ensaios “in vitro” de cultura de células osteoblásticas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A análise dos parâmetros osteogênicos foi feita através de ensaios de cultura de células osteoblásticas em superfícies de discos de titânio modificados com diferentes condições de jateamento e diferentes condições de ataque ácido. Os valores da adesão e proliferação celular, fosfatase alcalina e nódulos de mineralização, extraídos dos ensaios de cultura de células, foram ponderados por uma função soma para definir o nível da osteogênese local.

Os ensaios “in vitro” de cultura de células foram realizados com linhagem de células osteoblásticas, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Lyndon Cooper (UNC – USA). As culturas realizadas sobre a superfície dos corpos de prova analisaram a proliferação e viabilidade celular, a atividade de fosfatase alcalina e a formação de matriz mineralizada aos 1, 7, 14, 21 e 28 dias após o início da cultura de células. A Figura 1 mostra células no meio de cultura no instante inicial dos testes. A medida da proliferação e viabilidade celular foram feitas aplicando reagentes MTT (Invitrogen Corporation, EUA) e Isopropanol-Ácido (HCl) nas cristas mitocondriais que identificam a “vida” das células. A medida da atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi feita através de um kit comercial (Sigma, St. Louis, MO, EUA) seguindo as instruções do fabricante aos 7, 14 e 21 dias de cultura. Neste mesmo ensaio, foi feita a medida da proteína total utilizando o método de Bradford, BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, EUA). A medida dos nódulos de mineralização foi feita através de um corante de pigmentação vermelho-alaranjada denominado *Alizarin red S* 1% (Sigma, St. Louis, MO, EUA), após 28 dias de cultura.

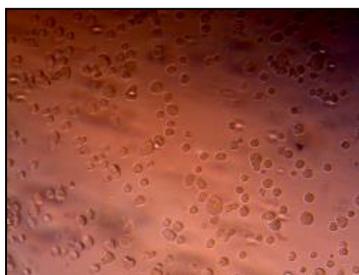


Figura 1. Cultura de células na fase inicial do processo de cultura.

As análises de cultura de células em medida da rugosidade foram feitas em discos de titânio com 6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, fornecidos pela empresa Neodent Implantes Osteointegráveis. Foram preparados 18 grupos com 27 discos cada (486 discos) com diferentes tratamentos superficiais (jateamento e ataque ácido). As condições de jateamento foram feitas variando a granulometria, o tempo de jateamento, a distância do jato e a pressão do jato na superfície. No ataque ácido variaram-se os tipos de ácido, a temperatura do ácido e o tempo de exposição das superfícies dos discos de titânio em contato com o respectivo ácido. A Tabela 1 mostra como foram classificados os grupos quanto as condições de jateamento. Considerando todas as condições de jateamento e ataques ácidos foram gerados 18 grupos (G01 a G18).

Tabela 1- Condições de jateamento para oito superfícies diferentes definidos pela empresa Neodent.

Groups	Granulometry (µm)	Time (s)	Distance from the attack (cm)	Pressure (Bar)
J1	240µm	3	10	20
J2	280µm	3	10	20
J3	280µm	4	10	15
J4	280µm	3	15	15
J5	280µm	4	10	20
J6*	---	--	--	--
J7	280µm	3	15	20
J8	280µm	2	10	30

* Sem Jateamento

2.1. Medida da rugosidade

Recentemente, alguns fabricantes passaram a jatear a superfície de seus implantes com partículas de óxido de titânio, pois apesar de representarem um maior custo no processo de fabricação, diminuíram as fontes de contaminação, aumentando a sua biocompatibilidade. A análise da rugosidade foi feita avaliando três perfis em linha, cada um com 4 mm de comprimento. Os perfis foram medidos em três posições arbitrárias na superfície do disco das amostras de cada

grupo. Através do programa UBSOft 1.9 (UBM Messtechnik GmbH Ettlingen, Germany). A Figura 2 mostra o processo de realização da interferometria a laser onde foram obtidos os parâmetros de rugosidade R_a .



Figura 2. (a) Sistema de interferometria a laser sobre a superfície

3. RESULTADOS

Os valores médios e o desvio padrão da rugosidade média são mostrados na Tabela 2. Utilizando uma análise de variância e um teste de Bonferroni com um nível de significância 0,05 (GraphPadSoftware, Inc. - Prism 5.0) verificou-se que os valores de R_a dos diversos grupos quando comparados com os valores do grupo controle (superfície lisa, J6) são estatisticamente diferentes.

Tabela 2. Rugosidade superficial para os 18 grupos analisados.

Groups	Sample plain	G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09
Ra ± SD (µm)	0,58 ± 0,21	0,97 ± 0,15	1,08 ± 0,16	0,97 ± 0,15	0,79 ± 0,04	0,91 ± 0,12	0,79 ± 0,06	1,10 ± 0,14	0,88 ± 0,05	0,85 ± 0,08
Groups	Sample plain	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18
Ra ± SD (µm)	0,58 ± 0,21	0,73 ± 0,16	0,76 ± 0,10	0,53 ± 0,04	0,81 ± 0,14	1,02 ± 0,12	0,93 ± 0,12	0,68 ± 0,19	0,80 ± 0,05	0,98 ± 0,06

A análise das diversas curvas permite observar uma influência da granulometria utilizada para a realização do jateamento da superfície e conseqüentemente nos valores de rugosidade média obtidos com a interferometria. As Figuras 3 (a) e (b) mostram duas superfícies analisadas no microscópio eletrônico de varredura (Hitachi S-4700, Tokyo, Japan - Chapel Hill Analytical and Nanofabrication Laboratory (CHANL) da University of North Carolina).

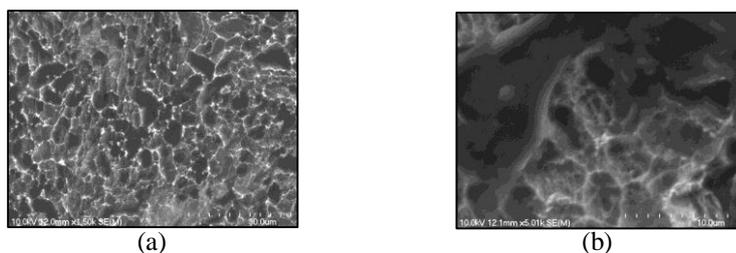


Figura 3. (a) Topografia superficial do grupo 04 com aumento de 1500X; (b) Topografia superficial do grupo 14 com aumento de 5000X

A Tabela 3 mostra os valores médios obtidos para os três parâmetros de análise celular envolvidos, ou seja, medida da atividade de fosfatase alcalina (η_1), proliferação e viabilidade celular (η_2), e nódulos de mineralização (η_3). A unidade para (η_1) é expressa em $\mu\text{mol}/\mu\text{g protein}/\text{min}$ (micromol de timolftaleína por micrograma de proteína por minuto). A unidade de (η_2) é número de células e a unidade para (η_3) é expressa em mm^2 (porcentagem da área corada com Alizarina Red S convertida na área superficial superior do disco em contato com as células). A Figura 4 mostra uma imagem real e uma imagem processada no software ImageJ para avaliar os nódulos de mineralização.

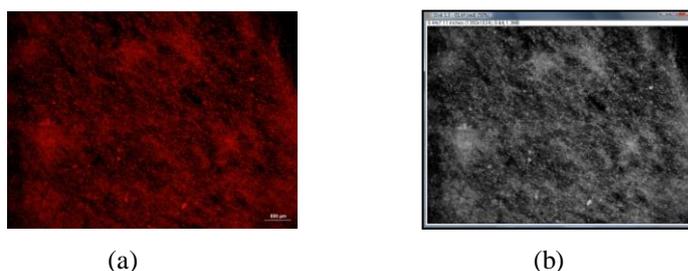


Figure 4. Imagens analisadas no software ImageJ para determinação dos nódulos de mineralização.

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros osteogênicos analisados nos ensaios de cultura de células.

Groups	$\eta_1(\mu\text{M}/ \mu\text{g protein} /\text{min})$			$\eta_2(\text{cells})$		$\eta_3(\text{mm}^2)$
	7 days	14 days	21 days	7 days	14 days	
G01	3,20	6,70	3,14	6,862	7,851	14,35
G02	2,56	8,46	4,50	6,266	10,357	11,91
G03	3,65	7,59	7,25	5,988	6,613	23,58
G04	3,41	10,52	4,79	5,816	14,815	19,46
G05	2,73	6,56	2,90	7,892	13,476	21,18
G06	2,41	7,25	4,40	8,480	8,422	18,21
G07	2,04	6,36	2,39	5,343	6,267	20,56
G08	2,73	6,54	2,64	8,284	9,613	9,59
G09	3,25	6,27	2,43	6,666	9,089	20,01
G10	2,69	6,37	4,62	7,557	7,595	19,48
G11	2,39	7,97	4,48	7,058	7,119	24,29
G12	2,18	9,06	3,03	7,238	9,184	22,72
G13	1,18	3,23	2,20	6,290	11,184	16,18
G14	1,76	4,71	4,61	6,290	8,750	19,98
G15	2,01	5,14	2,65	6,086	10,333	20,97
G16	3,90	5,54	3,85	6,813	6,464	18,50
G17	2,16	5,74	2,11	7,557	10,797	20,15
G18	3,03	5,33	4,99	10,204	11,535	16,23

4. CONCLUSÕES

O processo de osseointegração utilizando amostras de titânio com diferentes condições superficiais já foi estudado, quanto aos fundamentos celulares e químicos relacionados com a osteogênese. Neste trabalho observou-se que os parâmetros osteogênicos sofreram influência das condições superficiais. Neste caso, o valor máximo de ALP encontrado foi para o Grupo G04 ($\eta_1 = 10,52 \mu\text{M}/ \mu\text{g protein}/\text{min}$) considerando a ALP em 14 dias. Neste mesmo período, observou-se uma maior proliferação para o Grupo G04 ($\eta_2 = 14.815$ células). Por outro lado, o grupo 11 apresentou uma maior quantidade de nódulos de mineralização ($\eta_3 = 24,29 \text{ mm}^2$) após 28 dias de cultura. Foi observado que os níveis de rugosidade influenciam os parâmetros celulares, sendo encontrados valores ótimos ($R_a = 0,98 \pm 0,06 \mu\text{m}$; $E_s = 26,79 \pm 0,04 \text{ mJ}/\text{m}^2$, respectivamente).

5. REFERÊNCIAS

- BÁDENAS, C. J. A. **Tratamientos de Superfície sore Titânio Comercialmente Puro para La Mejora de la Osteointegración de los Implantes Dentales**. 2004. 417f. Tese de Doutorado – Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona – Espanha.
- BRÅNEMARK P. I.; BREINE, U.; ADELL, R.; RANSSON, B. O.; LINDSTRÖM, J.; OHLSSON, A. Intraosseous Anchorage of Dental Prostheses. I: Experimental Studies. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 3, n. 2, p. 81-100, 1969.
- BRÅNEMARK, P. I. 1985. **Introduction to Osseointegration: Tissue-Integrated Prostheses**. Quintessence: Chicago Publ. Co.
- BRÅNEMARK, P. I.; ZARB, G. A.; ALBRETSSON, T. **Prothèses Ostéointégrées**. Paris. CdP, 1988: (Tissue-Integrated Prostheses. Osseointegration in Clinical Dentistry. Chicago: Quintessence Books, 1985).
- DAVIES, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. **Journal of Dental Education**. v. 67, n. 8, p. 932-947, 2003.
- FRANCHI, M.; FINI, M.; MARTINI, D.; ORSINI, E.; LEONARDI, L.; RUGGERI, A.; GIAVARESI, G.; OTTANI, V. Biological Fixation of Endosseous Implants. **Micron**. v. 36, n. 7, p. 665-671, 2005.
- PUELO, D. A.; NANCI, A. Understanding and Controlling the Bone-Implant Interface. **Biomaterials**. v. 20, n. 23, p. 2311-2321, 1999.
- SCHMIDT, C.; STEINBACH, G.; DECKING, R.; CLAES, L. E.; IGNATIUS, A. A. IL-6 and PGE₂ Release by Human Osteoblasts on Implant Materials. **Biomaterials**. v. 24, n. 23, p. 4191 – 4196, 2003.
- WATZEK, G. 2004, 181 p. **Implants in Qualitatively compromised bone**. Quintessence Publishing Co, Inc. São Paulo.

6. AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento (FAPEMIG, CNPq e CAPES) pelo apoio financeiro. À FEMEC, LPM/UFU, BIOMOL/UFU e a NEODENT IMPLANTES OSTEOINTEGRÁVEISORTHO.

7. ABSTRACT

In the 60s, Brånemark and collaborators, based on clinical research, developed a new dental implant system that had a direct anchorage in bone tissue, without the interposition of soft tissue. This phenomenon called osseointegration involves biomechanical aspects and has not been fully clarified. In several studies it has been found that treatment of the implant surface, for example, surfaces treated with blasting and conditioned acid attack, have been one of the main factors that influence the osteogenesis and the osseointegration. Such surfaces would show appropriate conditions for a bone apposition faster enabling a load is applied in a shorter period of time. The objective of this study was to evaluate the influence of different surfaces obtained by different conditions of sandblasting and etching (18 surface treatments of conditions - G01 to G18) in cell growth on titanium disks. The evaluation test was performed using "in vitro" culture of osteoblastic cells Hfob 1:19 by measures of cell proliferation and viability, alkaline phosphatase and mineralization nodules were compared with the roughness levels in different groups. It was observed that these osteogenic parameters were influenced by the surface treatment changing cell growth. In this case, a larger change in the G04 group (particle size: 240, time: 3 sec distance: 10 cm, pressure: 20 bar at room temperature for 30 Acid ') was observed and less change in group G07 (particle size: 280 time: 3 s, distance: 10 cm, pressure: 20 bar, temperature acid 60 oC for 30 '). According to statistical analysis it was observed that compared with the average roughness, these two groups were statistically different (P <0.01), which may explain the changes in cell growth.

8. RESPONSABILIDADE PELAS INFORMAÇÕES

Os autores são os únicos responsáveis pelas informações incluídas neste trabalho.