

PROLIFERAÇÃO IN VITRO DE FIBROBLASTOS SOBRE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO QUIMICAMENTE MODIFICADAS

In vitro proliferation of fibroblasts on chemically modified titanium surfaces

Antonio Carlos Canabarro Andrade Junior¹, Lais de Carvalho², Ana Carolina Stumbo³, Kátia Sabino⁴, Walter Augusto Soares Machado⁵, Ricardo Guimarães Fischer⁶

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar a proliferação *in vitro* de fibroblastos sobre superfícies de titânio (Ti) quimicamente modificadas e sobre superfícies lisas. Placas de Ti foram atacadas com ácido fluorídrico e suas superfícies caracterizadas com microscópio eletrônico de varredura (Jeol, modelo JSM-5800) e rugosímetro (Mitutoyo, modelo SJ 201P - rugosidade média (Ra): $0.84 \pm 0.00 \mu\text{m}$). Fibroblastos (VERO) foram cultivados em triplicata (40.000 células/poço) sobre as superfícies experimentais de Ti (rugosas) e controles (lisas, Ra: $0.13 \pm 0.00 \mu\text{m}$) por 1, 2, 7 e 14 dias. A proliferação celular foi avaliada pelo método do MTT. Os resultados da absorbância (média \pm DP) sobre as superfícies lisas foram 0.08 ± 0.02 ; 0.11 ± 0.00 ; 0.78 ± 0.05 e 1.46 ± 0.02 , e sobre as superfícies rugosas foram 0.05 ± 0.01 ; 0.06 ± 0.01 ; 0.61 ± 0.04 e 1.34 ± 0.13 , respectivamente nos quatro períodos estudados. Os resultados no ensaio do MTT foram estatisticamente diferentes nos períodos de dois ($p = 0.011$) e sete dias ($p = 0.014$) de cultura, porém não foram encontradas diferenças após 14 dias ($p = 0.197$). Em conclusão, os fibroblastos inicialmente proliferaram mais lentamente nas superfícies de Ti tratadas quimicamente do que nas superfícies lisas, porém esta diferença não foi observada após 14 dias de cultura.

UNITERMOS: titânio; implante dentário; técnica de cultura de células; fibroblastos. R Periodontia 2006; 17:00-00.

INTRODUÇÃO

O implante dentário é aceito amplamente e está consolidado como um recurso precioso na reabilitação oral. A chave para o seu sucesso é a osseointegração, fenômeno que acontece em mais de 90% dos casos (ELLINGSEN, 1998). Além da interação osso-implante, é também fundamental que os tecidos moles promovam um selamento biológico eficaz para a manutenção do implante em longo prazo (LINDHE & BERGLUNDH, 2005).

A inserção transmucosa que ocorre nos implantes dentários os torna diferentes de outros dispositivos (como os ortopédicos, por exemplo), pois além da capacidade em suportar cargas, os implantes dentários permanecem parcialmente expostos ao ambiente bucal (MISCH, 2000). A inserção transmucosa é composta de duas partes: uma barreira de epitélio juncional, na região mais coronária, e uma zona de tecido conjuntivo subjacente, que contém feixes de fibras colágenas, e onde encontra-se um grande número de fibroblastos (MOON *et al*, 1999).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a adesão e proliferação dos fibroblastos podem ser influenciadas pelas características superficiais dos implantes (BRUNETTE, 1988; HORMIA *et al*, 1991), embora a real influência de pequenas variações de rugosidade pareça

¹ Professor Adjunto, Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e Universidade Veiga de Almeida (UVA)

² Professora adjunta, Laboratório de Cultura de Células, UERJ

³ Doutoranda, Laboratório de Cultura de Células, UERJ

⁴ Professora adjunta, Departamento de Bioquímica, UERJ

⁵ Professor adjunto, Curso de odontologia, Universidade Veiga de Almeida

⁶ Professor titular, Faculdade de Odontologia, UERJ

merecer mais investigações (MUSTAFA *et al.*, 1998).

O objetivo deste trabalho foi estudar a proliferação *in vitro* de fibroblastos sobre superfícies de titânio quimicamente modificadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Uma chapa de Ti grau 2 (Ti Brasil, São Paulo, Brasil) com 250 x 250 mm de tamanho e 1.1 mm de espessura foi cortada em amostras de 8 x 8 mm de lado e submetida a tratamento químico com solução ácida, em capela à temperatura ambiente, em duas etapas descritas a seguir: primeira etapa – ácido fluorídrico (HF) a 4% em volume por 60 segundos e segunda etapa: HF a 4% em volume e H₂O₂ a 8% em volume por 15 segundos. A função da segunda etapa era apenas promover a estabilização da camada de óxido superficial (KAWAHARA, 1995).

Todas as amostras foram submetidas a um processo de limpeza metalográfica em banho ultra-sônico, conforme a seguinte seqüência: acetona pró-análise (PA), álcool 70% e água destilada, respectivamente, por 15 minutos cada. Posteriormente, foram levadas à estufa por 24 horas, a 37° C e finalmente esterilizadas em autoclave modelo 2340 MK (Tuttnauer, São Paulo, Brasil) a 121° C por 20 minutos, em 103 kPa.

Caracterização da superfície de titânio

As morfologias das superfícies foram observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV - Jeol, JSM-5800, MA, EUA), operando a 20 kV, 80 µA e distância de trabalho de 13 mm, através de imagens de elétrons secundários (SE). Três imagens aleatórias, de três amostras distintas, foram obtidas por operador “cego”. Foram utilizados aumentos de 200 e 1000 vezes.

A rugosidade superficial foi quantificada em um rugosímetro de superfície (Mitutoyo SJ 201P, Miyazaki, Japão). Os valores de rugosidade foram obtidos de três amostras distintas. Cinco medidas foram efetuadas em cada amostra, ao longo de linhas horizontais de 4 mm, para obtenção da Ra (rugosidade média).

Cultura de fibroblasto (linhagem VERO)

Foram utilizadas no experimento células VERO, uma linhagem de fibroblastos de origem animal. Inicialmente, as células foram descongeladas de maneira padrão, em banho-maria. O material descongelado era colocado em tubo para centrífuga, com meio total suplementado (MTS - DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%, Gibco, NY, EUA), e centrifugado (2000 rpm) por cinco minutos. Após a retirada do sobrenadante, eram acrescidos 5 ml de MTS. Esta solução era plaqueada em garrafas

de 25 cm² (Falcon, NJ, EUA), até atingir a confluência (cerca de dois ou três dias).

Após a confluência, era promovida a digestão enzimática, para remoção das células da garrafa. Era utilizada uma solução composta de tripsina a 0.2% e verseno a 0.02% por três minutos. Após a inibição da tripsina com MTS, as células eram ressuspensas em novo MTS. Amostras de 10 µl desta mistura eram transferidas para um hemocitômetro (Housser Scientific Company, PA, EUA), observadas em microscópio de contraste de fase e contadas. As células eram transferidas para placas de 24 poços (Falcon, NJ, USA) e cultivadas em triplicata (40.000 células/poço) em MTS, trocado a cada dois dias, sobre as superfícies experimentais de Ti (rugosas) ou controles (poços com lamínulas de vidro) por 1, 2, 7 e 14 dias.

A proliferação celular foi avaliada indiretamente pelo método do MTT, que avalia colorimetricamente a capacidade redutora mitocondrial de células vivas. Foi utilizado um leitor de microplacas (espectrofotômetro CE3021, Cecil, Cambridge, Inglaterra) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Poços com MTS sem células foram utilizados como controle negativo. Quatro horas antes do término de cada período o sobrenadante era removido dos poços, que eram lavados duas vezes com PBS, para remoção de células não aderidas. Eram colocados 300 µl de MTS mais 10 µl de MTT, de uma solução de 5 mg/ml. Após quatro horas, a formação dos cristais de formazana era verificada em microscópio de contraste de fase. As amostras de Ti e as lâminas eram então removidas e colocadas em outra placa (vazia) de 24 poços. Eram acrescidos 200 µl de DMSO para a solubilização dos cristais de formazana formados. Após este procedimento, era realizada a leitura da densidade de cor de cada poço. Os resultados do MTT eram apresentados pela média (± desvio padrão) das três amostras de cada superfície estudadas nos quatro períodos.

Análise estatística

Os valores de rugosidade e de MTT, das duas superfícies, foram comparados utilizando-se o teste t para amostras independentes. Foi estabelecido o valor de p em 0.05.

RESULTADOS

A **figura 1** mostra o aspecto micrográfico obtido no MEV (modo SE) da superfície de Ti estudada. Nota-se a presença de picos e depressões em uma superfície aparentemente rugosa, porém regular e homogênea (**figura 1**). Estas características podem ser melhor observadas em maior aumento (**figura 2**).

Os valores de rugosidade encontrados foram de 0.84 (±0.00) para a superfície de Ti e de 0.13 (±0.00) para a superfície lisa (controle). A diferença encontrada foi considerada estatisticamen-

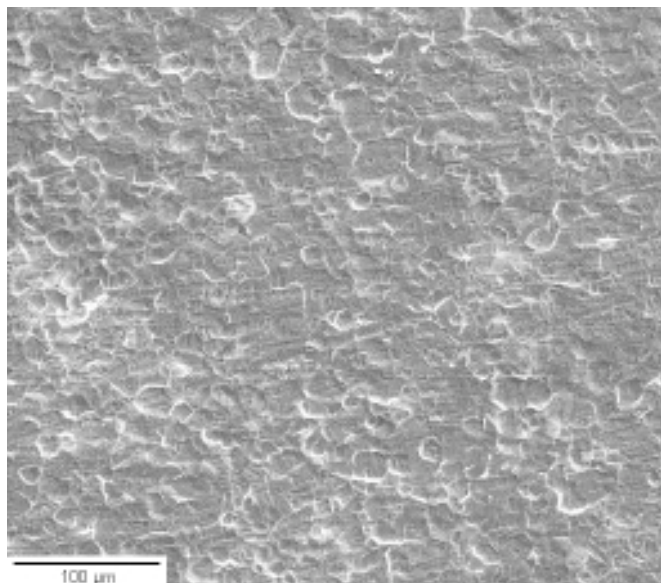


Figura 1. Micrografia eletrônica da superfície de Ti modificada quimicamente pelo HF a 4%, em modo SE. Aumento original: 200 x.

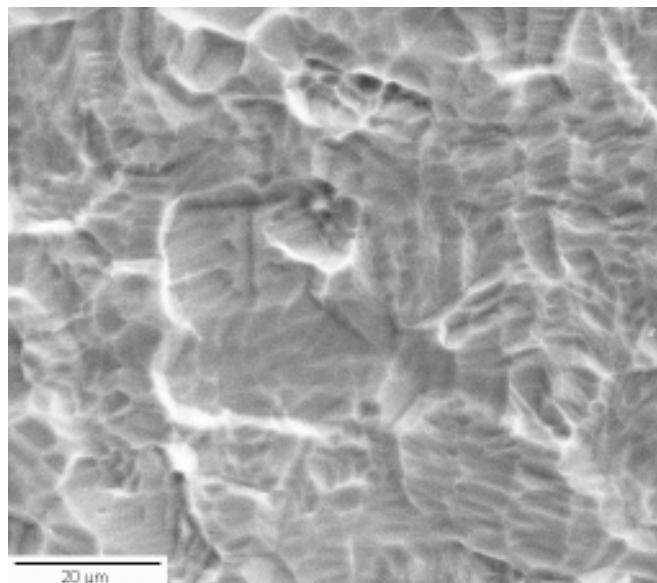


Figura 2. Micrografia eletrônica em maior aumento da superfície de Ti mostrada na figura anterior. Modo SE. Aumento original: 1000 x.

te significativa ($p < 0.001$) (tabela 1).

Após a verificação dos cristais de formazana formados nas superfícies controle (figura 3), eram realizadas a solubilização e a leitura da densidade de cor de cada poço. Os valores da absorbância proporcionais à proliferação celular, sobre as superfícies controle e de Ti, foram estudadas nos quatro períodos. Os resultados da absorbância (média \pm DP) sobre as superfícies lisas foram 0.08 ± 0.02 ; 0.11 ± 0.00 ; 0.78 ± 0.05 e 1.46 ± 0.02 , e sobre as superfícies rugosas foram 0.05 ± 0.01 ; 0.06 ± 0.01 ; 0.61 ± 0.04 e 1.34 ± 0.13 , respectivamente nos quatro períodos estudados. Os valores encontrados após um dia de cultura não apresentaram uma diferença significativa ($p = 0.101$), porém a diferença no ensaio do MTT nos períodos de dois ($p = 0.011$) e sete dias ($p = 0,014$) foi estatisticamente significativa. Aos 14 dias de cultura, porém, a diferença encontrada na proliferação celular não foi significativa ($p = 0.197$) (tabela 1).

DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram estudados os efeitos de uma superfície de Ti rugosa na proliferação de fibroblastos de origem animal. Estudar o comportamento dos fibroblastos é fundamental, pois estas células estão envolvidas com a formação e a renovação do tecido conjuntivo, que no implante é responsável, junto com o epitélio, pela barreira tecidual protetora ao tecido ósseo subjacente (MISCH, 2000).

A cultura celular permite estudos em nível celular de maneira bastante controlada (BACHLE & KOHAL, 2004). As vantagens da utilização de cultura de células em pesquisas com implantes são a natureza homogênea deste modelo e o curso temporal bem definido dos eventos (ARAÚJO *et al*, 2001). Em relação às

linhagens celulares, os benefícios incluem custos reduzidos, a reprodutibilidade em múltiplas culturas e a redução da morbidade e mortalidade celular. Porém, é importante lembrar que o comportamento de células orais (osteoblastos, fibroblastos, etc) parece ser diferente do comportamento de células de outras regiões do corpo (KASPERK *et al*, 1995; PALAIOLOGOU *et al*, 2001), assim como células de cultura primária parecem diferir de células de linhagem (MAILHOT & BORKE, 1998). Ainda assim, linhagens celulares são freqüentemente usadas para estudar os efeitos de diferentes topografias superficiais de implantes (BACHLE & KOHAL, 2004). A utilização destas células parece se justificar fortemente quando os benefícios citados são observados mais atentamente.

Tem sido sugerido que alterações na morfologia superficial de implantes de Ti possam seletivamente favorecer a adesão, tanto de células epiteliais como de fibroblastos, potencializando, assim, a formação de um selamento biológico entre os implantes e os tecidos adjacentes (DONLEY & GILLETTE, 1991). Os fibroblastos são células predominantes no ligamento periodontal e no tecido conjuntivo gengival, e tem um papel importante no funcionamento e na regeneração destes tecidos. A adesão destas células a proteínas da matriz extracelular dá-se através da expressão de integrina pelos fibroblastos. É importante destacar que a "estabilidade celular", conferida pelas integrinas, é profundamente necessária para manter a integridade estrutural dos tecidos (DONLEY & GILLETTE, 1991) e para controlar os movimentos dos fibroblastos (GUMBINER, 1996). Portanto, uma consideração importante na produção de implantes dentários é a criação de superfícies que promovam uma forte adesão com as células epiteliais, do tecido conjuntivo e do osso (GROESSNER-SCHREIBER *et al*, 2003).

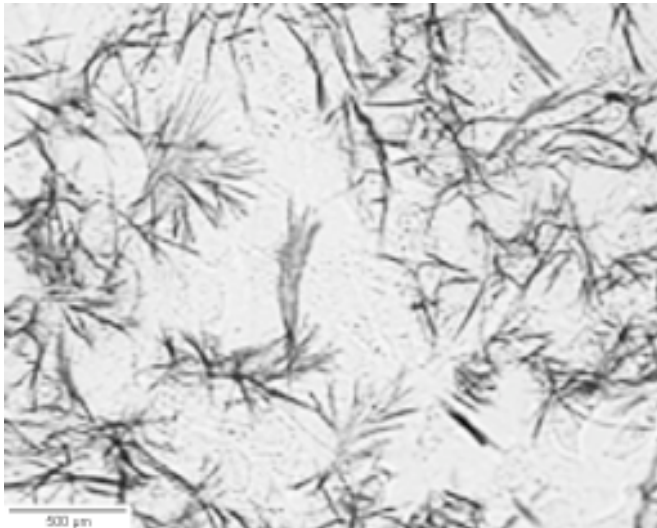


Figure 3. Fotomicrografia dos cristais de formazana formados com a colocação de MTT nos poços após 14 dias de cultura (superfície controle). Microscópio de contraste de fase. Aumento original: 40x.

Sabe-se que os tratamentos superficiais, assim como o processo de esterilização dos implantes, podem afetar o comportamento celular (ELLINGSEN, 1998). No presente estudo, foi observado que a proliferação dos fibroblastos foi menor no Ti (rugoso) aos dois e sete dias. Estes achados confirmam estudos anteriores *in vitro* que indicaram que a orientação e a proliferação de células em superfícies de Ti podem ser influenciadas pela topografia superficial (SAUBERLICH *et al*, 1999). GUY *et al* (1993) encontraram uma menor adesão e proliferação de fibroblastos em superfícies mais rugosas. KONONEN *et al* (1992) inclusive sugerem que superfícies lisas devam ser preferíveis às rugosas na região adjacente aos tecidos moles. Porém, estes achados não foram confirmados em estudo *in vivo*, utilizando cães. Os autores demonstraram que a adesão de tecidos moles não foi influenciada pela rugosidade da superfície de Ti (ABRAHAMSSON *et al*, 2002). De fato, no presente estudo, a proliferação aos 14 dias foi semelhante nas duas superfícies estudadas (rugosa e lisa). Portanto, as diferenças que existem no comportamento dos fibroblastos em diferentes superfícies parecem acontecer principalmente nas fases iniciais, não contra-indicando o uso de qualquer superfície em longo prazo. Porém, é sempre importante lembrar que a grande variedade dos tratamentos superficiais re-

alizados nos diferentes trabalhos, assim como as diferenças nos tipos celulares e períodos de cultura, tornam difícil a comparação com outros trabalhos. Por isso, conforme sugeriram BACHLE & KOHAL (2004), pode ser fundamental no futuro a condução de estudos *in vitro* em condições e protocolos padronizados de modo a possibilitar a comparação dos resultados.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram que os fibroblastos VERO proliferaram mais lentamente nas superfícies de titânio rugosas do que nas superfícies lisas, porém esta diferença não foi observada após 14 dias de cultura.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the *in vitro* proliferation of fibroblasts on chemically modified titanium (Ti) surfaces and on smooth surfaces. Plates of Ti were treated with hydrofluoric acid and characterized by scanning electronic microscope (Jeol, model JSM-5800) and profilometer (Mitutoyo, model SJ 201P – average roughness (Ra): 0.84 ±0.00 µm). Fibroblasts (VERO) were cultivated in triplicate (40.000 cells/well) on experimental Ti surfaces (rough) and on control surfaces (smooth, Ra: 0.13 ±0.00 µm) for 1, 2, 7 and 14 days. Cellular proliferation was evaluated by MTT. The results of absorbance (average ± standard deviation) on smooth surfaces were 0.08 ±0.02; 0.11 ±0.00; 0.78 ±0.05 and 1.46 ±0.02, and on rough surfaces were 0.05 ±0.01; 0.06 ±0.01; 0.61 ±0.04 and 1.34 ±0.13, respectively in the 4 periods of time. The results of MTT assay for treated and control surfaces were significantly different in 2 (p= 0.011) and 7 (p= 0.014) days of culture, but no difference was found after 14 days (p= 0.197). In conclusion, fibroblasts initially proliferated slower on chemically modified Ti surfaces than on smooth surfaces, but this difference was not observed after 14 days of culture.

UNITERMS: titanium; dental implantation; cell culture technique; fibroblasts.

Tabela 1

| VALORES (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO) DA RUGOSIDADE MÉDIA (RA) E DA ABSORBÂNCIA (A/CM²), NOS QUATRO PERÍODOS ESTUDADOS, PARA A SUPERFÍCIE DE TI QUIMICAMENTE MODIFICADA E PARA A SUPERFÍCIE CONTROLE (LISA) | | | | | |
|---|--------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|
| Superfícies | Ra (n= 15) | Absorbância (MTT) | | | |
| | | 1 dia (n= 3) | *2 dias (n= 3) | *7 dias (n= 3) | 14 dias (n= 3) |
| Ti (rugosa) | *0.84 ± 0,00 | 0,05 ± 0,01 | 0,06 ± 0,01 | 0,61 ± 0,04 | 1,34 ± 0,13 |
| Controle (lisa) | *0.13 ± 0.00 | 0,08 ± 0,02 | 0,11 ± 0,00 | 0,78 ± 0,05 | 1,46 ± 0,02 |

*Diferença estatisticamente significativa (p< 0.05)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Linder E, Wennerberg A, Lindhe J. The mucosal attachment to titanium implants with different surface characteristics. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2002;29:448-455.
- 2- Araujo NS, Jaeger RG, Todescan FF, Jaeger MMM, Groll W. Cell culture test for assessing attachment and proliferation on titanium dental implants with modified surfaces. *R P G Rev Pos Grad* 2001;8:103-109.
- 3- Bachle M, Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Impl Res* 2004;15:683-692.
- 4- Brunette DM. The effect of implant surface topography on the behaviour of cells. *Int J Oral Maxillofac Impl* 1988;3:231-246.
- 5- Donley TG, Gillette WB. Titanium endosseous implant-soft tissue interface: a literature review. *J Periodontol* 1991;62:153-160.
- 6- Ellingsen JE. Surface configurations of dental implants. *Periodontol* 2000 1998;17:36-46.
- 7- Groessner-Schreiber B, Neubert A, Muller WD, Hopp M, Griepentrog M, Lange KP. Fibroblast growth on surface-modified dental implants: an in vitro study. *J Biomed Mater Res* 2003;15:591-599.
- 8- Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996;84:345-357.
- 9- Guy SC, McQuade MJ, Scheidt MJ, McPherson JC 3rd, Rossmann JA, Van Dyke TE. In vitro attachment of human gingival fibroblasts to endosseous implant materials. *J Periodontol* 1993;64:542-546.
- 10- Hormia M, Kononen M, Kivilahti J, Virtanen I. Immunolocalization of proteins specific for adherents junctions in human gingival epithelial cells grown on differently processed titanium surfaces. *J Periodont Res* 1991;26:491-497.
- 11- Kasperk C, Wededal J, Strong D, Farley J, Wangerin K, Gropp H, Ziegler R, Baylink DJ. Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2511-2517.
- 12- Kawahara H. Biomaterials for dental implants. In: Wise DL. *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 1995. p. 1469-524.
- 13- Kononen M, Hormia M, Kivilahti J, Hautaniemi J, Thesleff I. Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res* 1992;26:1325-1341.
- 14- Lindhe J, Berglundh T. A inserção transmucosa. In: Lindhe J, Karring T, Lang N. *Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral*. 4th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 807-815.
- 15- Mailhot JM, Borke JL. 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.
- 16- Misch CE. *Implantes dentários contemporâneos*. São Paulo: Santos, 2000.
- 17- Moon IS, Berglundh T, Abrahamsson I, Linder E, Lindhe J. The barrier between the keratinized mucosa and the dental implant. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 1999;26:658-663.
- 18- Mustafa K, Silva 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.
- 19- Palaiologou AA, Yukna RA, Moses R, Lallier TE. Gingival, dermal, and periodontal ligament fibroblasts Express different extracellular matrix receptors. *J Periodontol* 2001;72:798-807.
- 20- Sauberlich S, Klee D, Richter EJ, Hocker H, Spiekermann H. Cell culture tests for assessing the tolerance of soft tissue to variously modified titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res* 1999;10:379-393.

Endereço para correspondência:
 Antonio Carlos Canabarro Andrade Junior
 Boulevard 28 de Setembro, 157
 Faculdade de Odontologia (UERJ)
 Vila Isabel
 CEP: 20551-030 - Rio de Janeiro - RJ
 Tel/Fax: (21) 2587-6382
 E-mail ajunior@uerj.br