



Avaliação do comportamento de osteoblastos sobre diferentes superfícies de implantes

P93

Mesquita P¹, Raposo H², Felino A², Afonso A³

¹Professor Auxiliar da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto
²Professor Catedrático da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto
³Professor Associado com Agregação da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Objetivos

As características de superfície dos implantes dentários revestem-se de uma importância extrema uma vez que é nessa zona que ocorrem as reações biológicas que conduzem, quando as condições são favoráveis, à osteointegração^{1,2}. Fatores como a microtopografia, nomeadamente a rugosidade, e a composição química superficial são importantes pois podem condicionar a osteogénese desde as fases iniciais, moleculares, até às fases mais avançadas, celulares, devendo ser analisados sempre que se procuram interpretar resultados referentes ao fenómeno da osteointegração e ao desempenho de implantes³⁻⁵. No presente trabalho procurou-se analisar o comportamento biológico de células osteoblásticas *in vitro* quando em contacto com superfícies implantares com diferentes microtopografias.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 264 implantes em titânio comercialmente puro de graus III e IV que foram divididos em seis grupos: grupos 1 e 2 – implantes maquinados, grupos 3, 4 e 5 – implantes submetidos a jateamento e ataque ácido, segundo protocolos diferentes, e grupo 6 formado por implantes revestidos a *spray* de plasma de titânio. Os implantes do grupo 5 eram, segundo o fabricante, uma evolução relativamente aos implantes pertencentes ao grupo 4, apresentando o mesmo tipo de tratamento de superfície embora realizado segundo um protocolo distinto.

Os 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 micrótomo para tecidos duros não descalcificados. As amostras obtidas foram submetidas a um processo de limpeza metalográfica, em banho ultra-sónico, secas numa estufa à temperatura de 37 C, durante 24 horas, e esterilizadas, em mangas individuais, em autoclave a uma temperatura de 121 C e uma pressão de 124 KPa, durante 45 min.

Os implantes dos seis grupos foram semeados com células de medula óssea humana e cultivados por um período de 33 dias tendo o comportamento celular sido avaliado, ao longo do tempo de cultura, quanto 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, quanto à atividade 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.

Resultados

O processo de adesão celular foi avaliado nas primeiras 24 horas de cultura através de Microscopia Electrónica de Varrimento (MEV) (Fig. 1). As células osteoblásticas demonstraram capacidade para aderir a todas as superfícies analisadas não se observando, para este tempo, diferenças significativas entre os diferentes grupos de implantes.

A morfologia celular e a organização do citoesqueleto foram observadas com recurso à Microscopia Confocal de Varrimento Laser após coloração imunocitoquímica para o citoesqueleto de F-actina e núcleo (Fig. 2). 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, parece apresentar 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 dia 28 de cultura, a superfície dos implantes apresentou-se praticamente recoberta por uma camada celular (Fig. 3). As imagens obtidas através de MEV mostram diferenças relativamente ao padrão de crescimento celular nas várias superfícies. Os implantes dos grupos 1 e 2 apresentam uma camada celular distribuída em forma de paliçada e um padrão de crescimento diferente nas duas vertentes. Os implantes dos grupos 3, 4 e 5 apresentam uma camada celular com um grau de complexidade elevado, com as células a emitirem prolongamentos citoplasmáticos e sendo visíveis numerosas estruturas fibrilares. Os implantes do grupo 6 apresentam uma camada de células dispostas aleatoriamente que se adaptam às irregularidades da superfície e estabelecem numerosos contactos intercelulares.

Durante a primeira semana a atividade da fosfatase alcalina revelou-se pouco expressiva para os seis grupos de implantes mas a partir da segunda semana observou-se um aumento significativo da atividade enzimática. O pico máximo da atividade 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 os valores começaram a diminuir, após este pico, durante o restante tempo de cultura (Gráfico 1).

Aos 21 dias não se observaram diferenças significativas na expressão génica dos marcadores osteoblásticos analisados (colagénio tipo I, fosfatase alcalina, osteoprotegerina e BMP-2) (Gráfico 2).

A avaliação quantitativa do processo de mineralização da matriz foi efetuada através da determinação dos níveis de cálcio ionizado no meio de cultura, ao longo do tempo de cultura (Gráfico 3) mostrando uma diminuição mais precoce dos níveis para os implantes do grupo 3.

A análise aos 28 dias, através de MEV, dos implantes colonizados, revelou a presença de uma camada praticamente contínua de células osteoblásticas contendo depósitos minerais de aspeto globular em associação com a matriz extracelular. De evidenciar, no entanto, que o implante do grupo 3, parece revelar 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 (Fig. 4). Através da espectrometria de difração de Raios X foi 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) sugerindo que as formações globulares presentes na camada celular contêm fosfato de cálcio.

Conclusões

Neste trabalho confirmou-se a excelente biocompatibilidade dos implantes confeccionados em titânio comercialmente puro⁶ já que todos promoveram a adesão celular à sua superfície e a sua proliferação, independentemente do tipo de tratamento de superfície. A diferenciação osteoblástica e a formação de depósitos minerais ocorreram em todas as superfícies analisadas, independentemente da macro e microtopografia do implante. Apesar disso, parece ser evidente que a superfície dos implantes influencia o comportamento biológico, *in vitro*, para o conjunto dos parâmetros analisados mesmo para implantes com a mesma designação de superfície embora preparada segundo protocolos distintos.

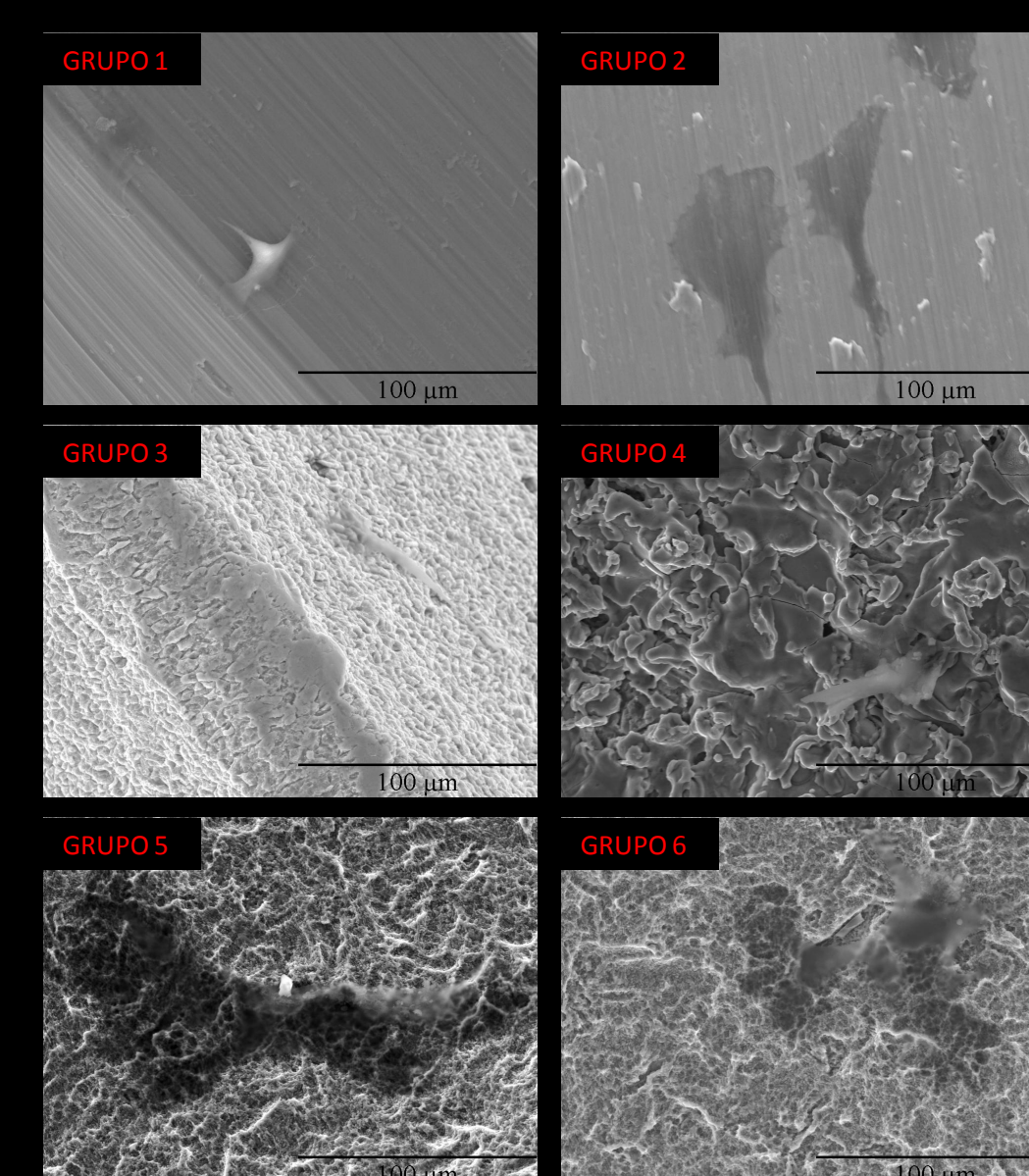


Fig.1 - Morfologia celular às 24h de cultura, nas seis superfícies analisadas. Imagens obtidas por MEV (100x).

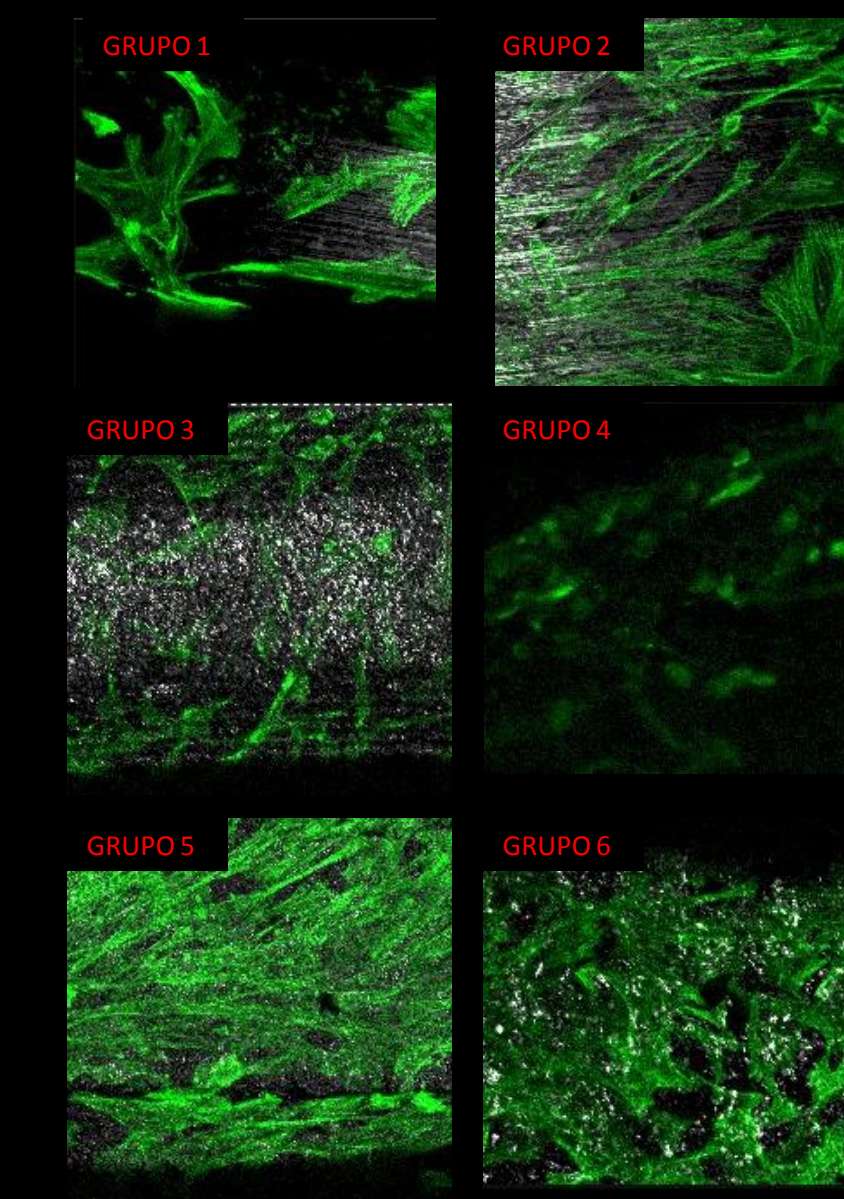


Fig.2 - Morfologia celular aos 21 dias de cultura, nas seis superfícies analisadas. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varrimento Laser (400x).

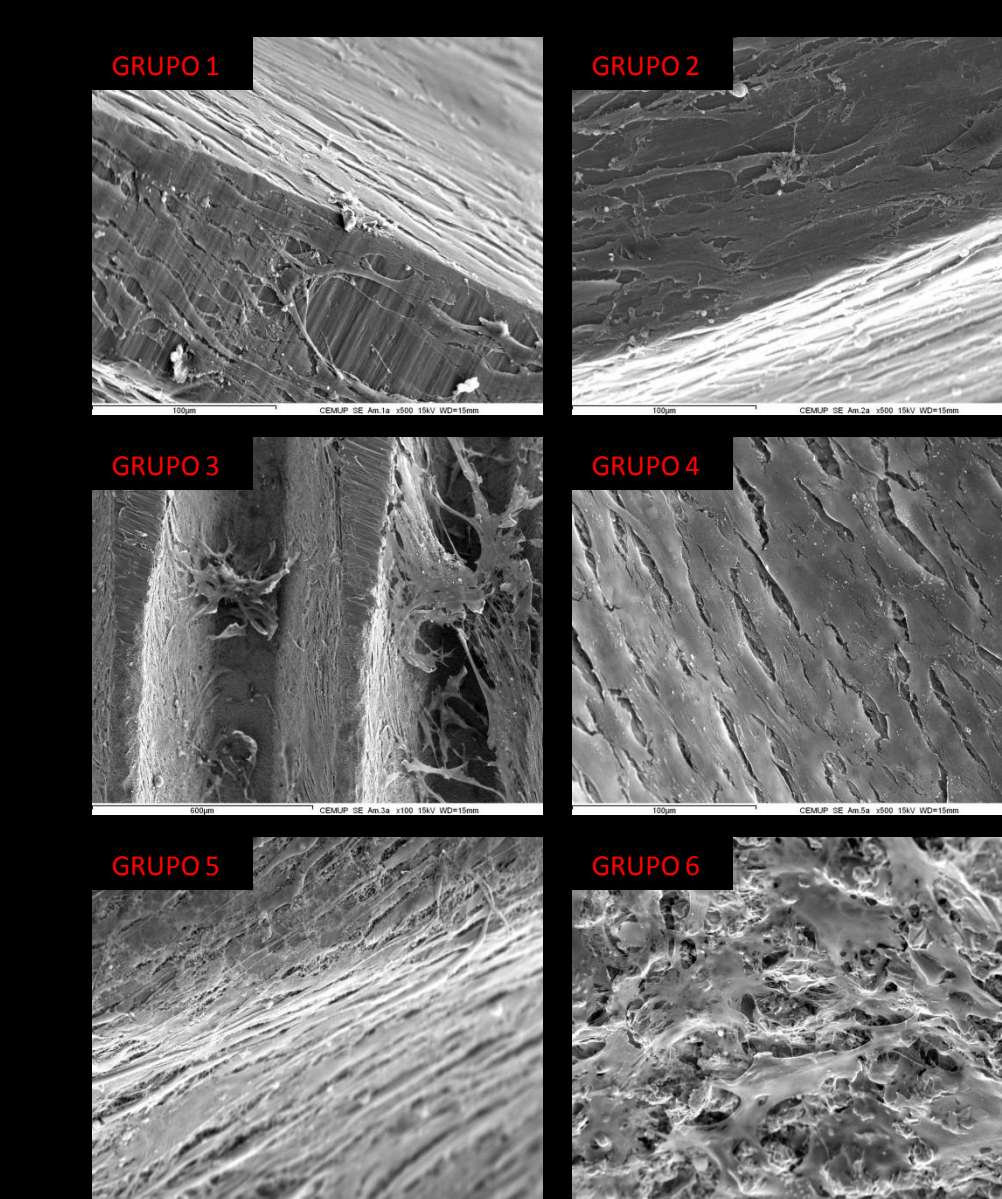


Fig.3 - Padrão de crescimento celular aos 28 dias de cultura. Imagens obtidas por MEV (500x).

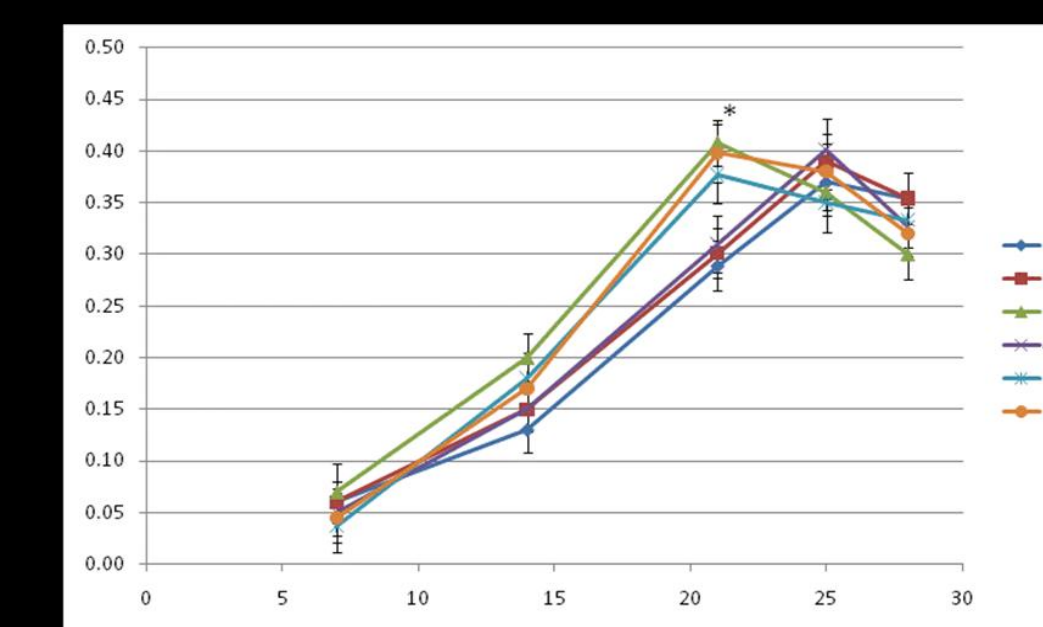


Gráfico 1 - Atividade de fosfatase alcalina nos seis grupos de implantes, ao longo dos 28 dias de cultura.

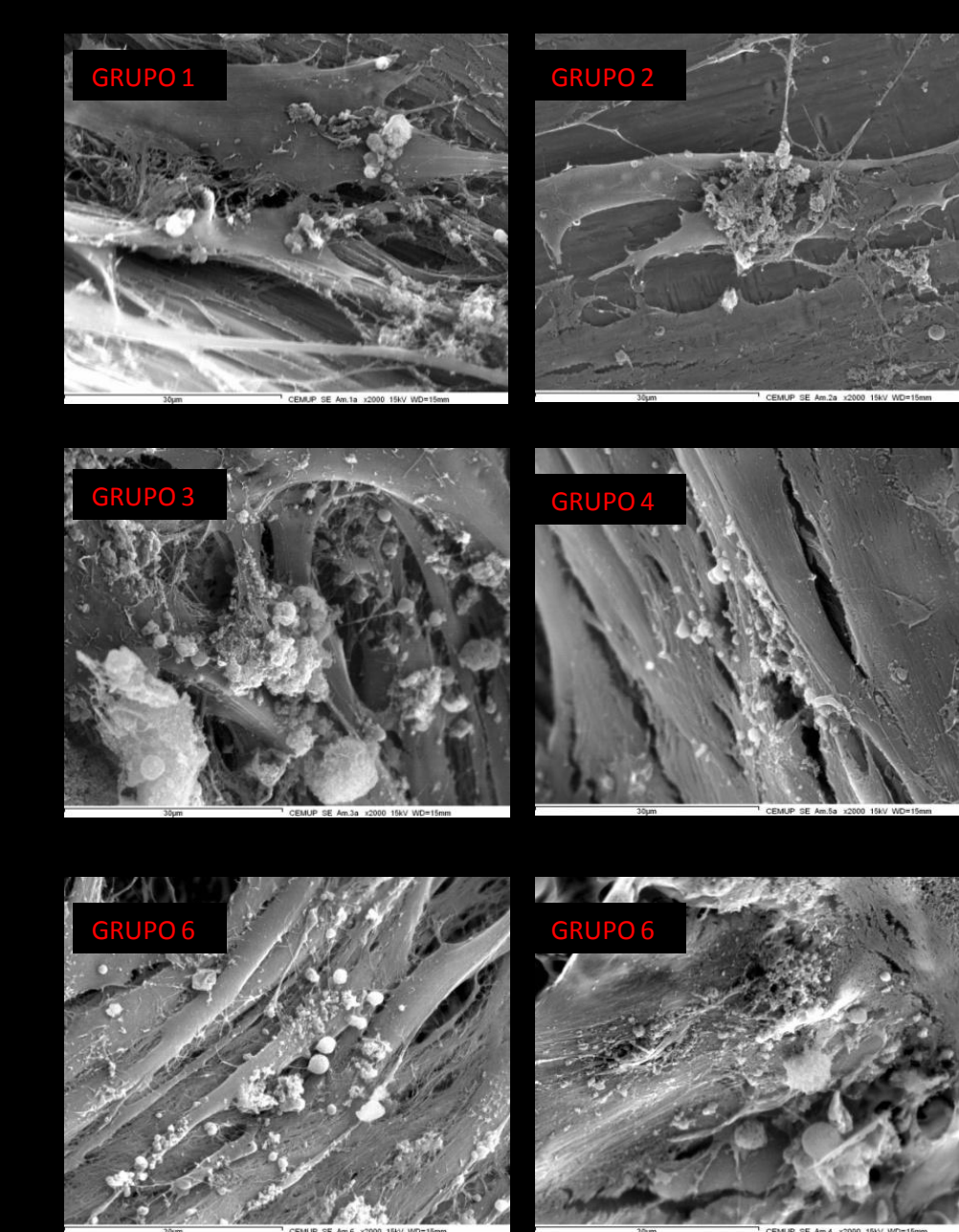


Fig.4 - Imagens obtidas por MEV, em grande ampliação (2.000x), da camada celular presente na superfície dos seis grupos de implantes, no dia 28 de cultura.

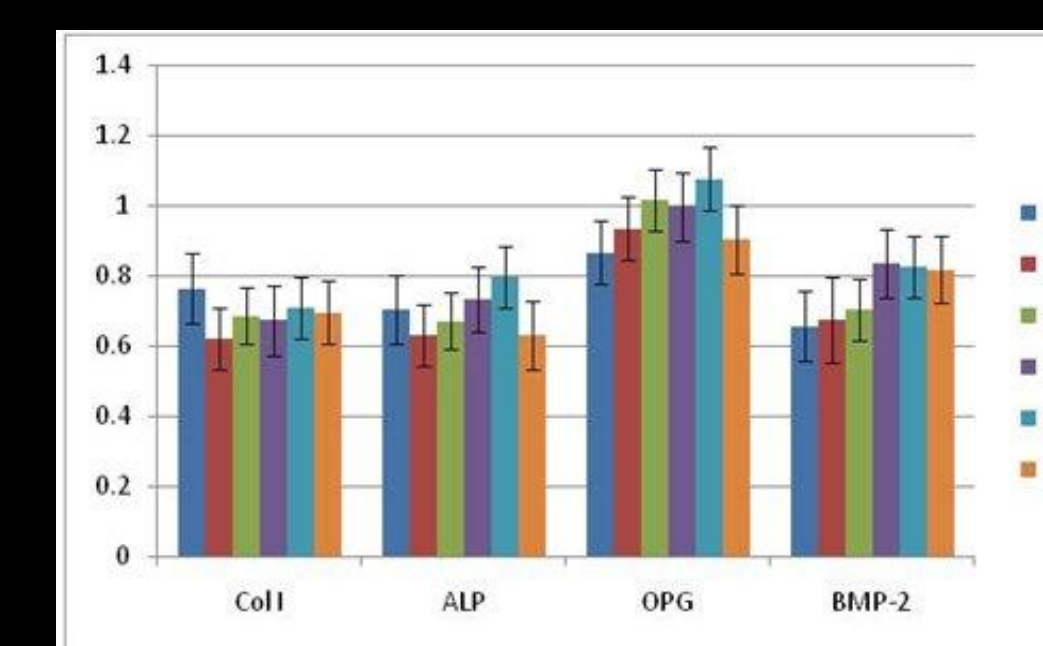


Gráfico 2 - Expressão génica de marcadores osteoblásticos, avaliada por RT-PCR, no dia 21 de cultura, nos seis grupos de implantes.

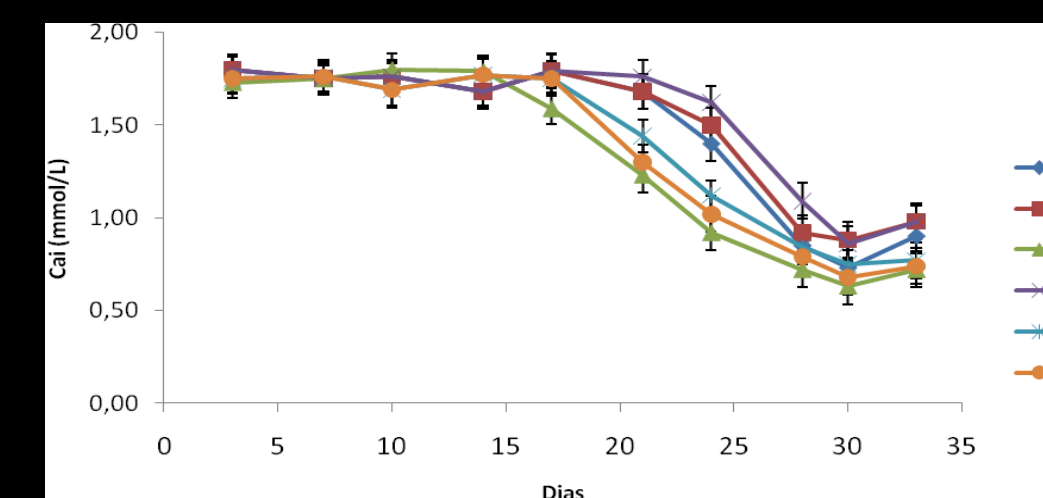


Gráfico 3 - Evolução dos níveis de cálcio ionizado no meio de cultura ao longo do tempo de incubação (33 dias).

*Estatisticamente diferente dos valores relativos ao implante do grupo 1 ($p < 0,05$) para os implantes dos grupos 3, 5 e 6.

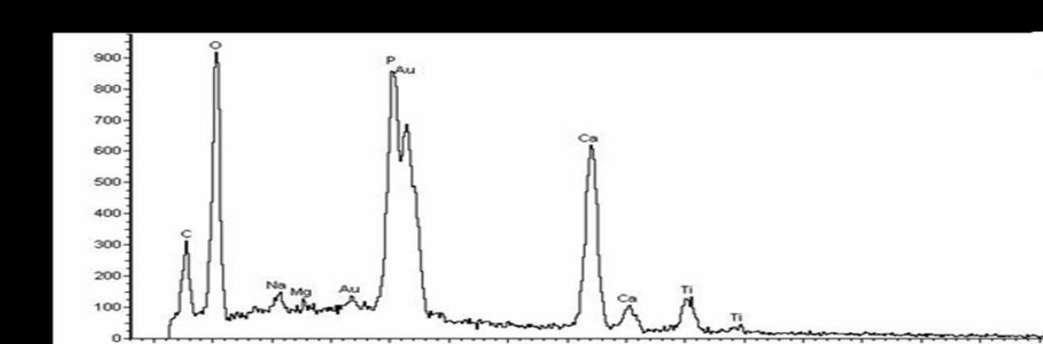


Gráfico 4 - Espectro de difração de Raios X representativo das estruturas globulares presentes nas culturas celulares, no dia 28 de cultura.

Bibliografia

- Puleo D, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomater*. 1999;20:2311-2321.
- 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.
- 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 Implants Res*. 2006;17:521-526.
- Capilla M, Oñed 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.
- Sul Y-T, Johansson C, Byon E, Albrektsson T. The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive titanium implants. *Biomater*. 2005;26:6720-6730.
- Kasemo B, Lausmaa J. Selección del metal y características de la superficie. In: Branemark P-I, Zarb G, Albrektsson T. *Prótesis tejidointegradas: La osseointegración en la odontología clínica*. Berlin: Quintessence; 1987:99-116.