

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUPERFÍCIES DE TITÂNIO SOBRE OS NÍVEIS DE TGFβ1 PRODUZIDOS EM CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS

CLÁUDIA CAROLINA LOPES MOURA¹, CAMILLA CHRISTIAN GOMES MOURA²,
MARIA APARECIDA DE SOUZA³, PAULA DECHICHI⁴.

RESUMO: O titânio é bastante utilizado para confeccionar implantes dentários e ortopédicos devido as suas propriedades físicas e biocompatibilidade. Modificações na superfície e rugosidade do titânio podem ser realizadas a fim de melhorar o reparo ósseo ao redor do implante. Este reparo, em sua fase inicial, cursa com inflamação mediada por células mononucleares. Assim, o presente estudo teve como objetivo analisar a influência do tipo de tratamento de superfície do titânio no perfil de TGFβ1 produzido por mononucleares *in vitro*. Células mononucleares (PBMC) foram obtidas do sangue periférico de adultos saudáveis, e plaqueadas por 24 horas sobre três superfícies: usinada (grupo S1), jateada/subtraída (grupo S2) e jateada/subtraída seguida por deposição de Ca e P amorfo (grupo S3). Após 24 horas, as placas passaram por teste de viabilidade celular por MTT-Formazan, com leitura a 570 nm. Também em 24hs, foram realizadas análise da morfologia celular, ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), e dosagem de TGFβ1 do sobrenadante, por Elisa Sanduíche. A sensibilidade de detecção foi 60 pg/ml. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para análises múltiplas ($p < 0,05$). Não foram detectadas diferenças significativas nos níveis de absorbância dos mononucleares pelo MTT-Formazan ou nos níveis TGFβ1 produzidos em 24 horas sobre as três superfícies ($p > 0,05$). Em relação à morfologia, os PBMC mostraram-se mais espalhados em S1. Conclui-se que o tipo de superfície não interferiu na viabilidade celular ou na produção de TGFβ1, entretanto no grupo S1 induziu modificações na morfologia dos mononucleares.

PALAVRAS-CHAVE: titânio, implantes dentários, rugosidade, mononucleares, TGFβ1.

¹Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina, Campus Umuarama, Av. Pará, 1720, Bl. 2U, Uberlândia, CEP: 38405-320; E-mail: cclmoura@yahoo.com.br.

²Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Morfologia, Campus Umuarama, Av. Pará, 1720, Uberlândia, CEP: 38406-000; E-mail: camillahistologia@yahoo.com.br.

³Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Patologia, Laboratório de Biologia Molecular, Campus Umuarama, Av. Pará 1720, Bl. 6T, Uberlândia, CEP: 38400-902; E-mail: masouza@ufu.br.

⁴Universidade Federal de Uberlândia, Área de Morfologia, Setor de Histologia, Campus Umuarama - Av. Pará, 1720, Bl. 2B, Uberlândia, CEP: 38405-320; E-mail: pauladechichi@umuarama.ufu.br.

ABSTRACT: Titanium is often used to make dental and orthopedic implants due to its great physical properties and biocompatibility. Modifications in titanium surface and roughness can already be done in order to improve bone repair around the implants. The initial phase of this repair consists of an inflammatory process mediated by mononuclear cells. That being pointed, the aim of this study was to analyze the influence of titanium surface treatment in the TGF β 1 profile produced by human mononuclear cells *in vitro*. Mononuclear cells were obtained from peripheral blood of healthy human adults and plated for 24 hours over three surfaces: titanium as-machined surface (group S1), blasted/ etched surface (group S2), and blasted/etched Ca- and P-based coating surface (group S3). After 24h, the plates were submitted to a viability test using MTT-Formazan which was then read at 570 nm. Also at 24h, was analyzed the cell morphology using a scanning microscope (SEM) and the TGF β 1 concentration of the supernatant determined by Elisa Sandwich. The sensibility detection level was 60 pg/ml. Non-parametric Kruskal-Wallis test for multiple analyses ($p < 0.05$) was applied after the normality test. There were not found any significant difference in the absorbance levels of mononuclear by MTT-Formazan or in the TGF β 1 levels produced at 24 hours on all three surfaces ($p > 0.05$). Considering cell morphology, PBMC cultures showed spread cells in group S1. Therefore, the type of surface did not interfere in cell viability or TGF β 1 production; however it induced modifications in mononuclear cell morphology in group S1.

KEYWORDS: titanium, dental implants, roughness, mononuclear, TGF β 1.

INTRODUÇÃO

A implantodontia representa um dos maiores avanços da Odontologia nos tempos recentes. A busca por um substituto mais próximo possível do elemento dental perdido, fez com que diferentes sistemas de implantes, utilizando os mais diversos materiais fossem utilizados, como o implantes agulhados, subperiostais e

laminados (Amarante & Lima, 2001; Albrektsson, 2005).

Esses implantes odontológicos baseavam-se no empirismo e fracassaram devido à falta de estudos clínicos e científicos controlados. Entretanto, na década de 60, Branemark e colaboradores, apoiados em pesquisas básicas e clínicas, iniciaram o desenvolvimento de um novo sistema de implantes. Esse novo sistema de implantes baseava-se numa ancoragem

direta no tecido ósseo intacto, sem a interposição de tecido mole, denominada osseointegração (Amarante & Lima, 2001; Simon & Waston, 2002) Inicialmente não foi possível demonstrar o fenômeno de osseointegração devido à ausência de equipamento que permitisse cortar o tecido ósseo intacto, sem a remoção do implante metálico, o que só foi demonstrado claramente por Schroeder e colaboradores em 1976 (Albrektsson, 2005).

Diversos metais como aço inoxidável, titânio, cobalto e ligas de cobre-alumínio são empregados para confecção desses dispositivos (Puelo & Nanci, 1999; Amarante & Lima, 2001; Davies, 2003; Schmidt et al., 2003), entretanto, o titânio por suas excelentes propriedades físicas tem apresentado melhores resultados, possibilitando maior ancoragem óssea sem a interposição de camada de conjuntivo fibroso (Xavier et al., 2003). A camada de óxido de titânio formada após o contato desse metal com ar atmosférico parece favorecer o processo de neoformação óssea (Davies, 2000).

Essa nova geração de implantes endósseos, apresenta grande previsibilidade clínica. Estudos longitudinais demonstraram taxas de sucesso acima de 95% em tratamentos com os implantes de titânio, desde que adequadamente utilizados (Davies, 2000; Albrektsson, 2005).

Contudo, com intuito de acelerar o processo de reparo ósseo, permitindo a realização de casos com carga imediata e a instalação em áreas pobres em tecido ósseo, foram desenvolvidos novos sistemas de implantes, baseados no protocolo original de Branemark e colaboradores. Estes sistemas apresentam variações no desenho do parafuso, composição do titânio, topografia e tratamento de superfície (Amarante & Lima, 2001; Brunette & Chehroudi, 1999; Davies, 2000).

O tipo de tratamento de superfície influencia a adesão, diferenciação e morfologia celular na interface do implante (Brunette & Chehroudi, 1999; De Oliveira & Nanci, 2004; Rosa & Beloti, 2003; Xavier et al., 2003; Li et al., 2004), embora em alguns tipos de tratamento, esses efeitos sejam negativos, como nos tratamentos por adição (Amarante & Lima, 2001).

Nos implantes tratados por adição, são incorporadas substâncias ou partículas, com o objetivo de favorecer a diferenciação de osteoblastos e a produção de matriz, acelerando a velocidade e a qualidade da neoformação óssea (Coelho et al., 2009). No entanto, alguns estudos observaram que as partículas incorporadas por adição soltam-se da superfície do titânio, são fagocitadas por macrófagos e estimulam a produção de citocinas pró-

inflamatórias, retardando o processo de reparo (Amarante & Lima, 2001; Coelho et al., 2009).

Jateamentos na superfície do titânio, seguidos ou não, de ataque ácido, assim como tratamentos eletrolíticos, possibilitaram o desenvolvimento de superfícies do tipo SLA (Sandblasted, large grit, acid-etched) e TPS (Titanium plasma spray) (Rosa & Beloti, 2003; Xavier et al., 2003; Sammons et al., 2005; Nagem Filho et al., 2007). Essas superfícies encontram-se comercialmente disponíveis e têm sido amplamente estudadas.

Atualmente, existe uma grande variedade de tratamentos de superfície, que combinam técnicas de jateamento e ataque ácido, deposição eletroforética de íons, bombeamento com feixes de laser e também incorporação de compostos bioativos como cálcio (Ca) e fósforo (P). Elas resultam em variações na topografia de superfície e podem favorecer a osteogênese *in vitro* (Coelho et al., 2009 A). As técnicas de modificações da superfície por meio de incorporação de Ca e P ou hidroxiapatita têm como objetivo mimetizar o microambiente celular e aumentar a velocidade de deposição óssea, acelerando a mineralização da matriz (Coelho et al., 2009 A). No entanto, esse tipo de superfície apresenta como limitação, o potencial de dissolver a

cobertura de Ca e P (Coelho & Lemons, 2009), estimulando eventos pró-inflamatórios e gerando instabilidade do implante (Lemons, 2004).

Várias técnicas têm sido usadas em escala comercial para incorporação de Ca e P, entre elas deposição sol-gel, a laser, jateamento e deposição por feixes iônicos (Coelho et al., 2009 A). As superfícies geradas por algumas dessas técnicas, em escala nanométrica têm se mostrado as mais estáveis, com menor taxa de dissolução (Mendes, Moineddin & Davies, 2008; Coelho et al., 2009 A).

Embora vários estudos tenham investigado os efeitos da topografia e tratamento de superfície dos implantes no reparo ósseo, ainda permanecem dúvidas sobre o comportamento dessas superfícies no microambiente biológico.

Durante o procedimento cirúrgico para instalação dos parafusos de titânio necessários aos implantes, ocorre lesão do tecido ósseo rompendo vasos sanguíneos, promovendo sangramento (Hunt, 1990; Davies, 2003; Franchi et al., 2005). O sangue entra em contato com a superfície do implante, que será recoberta por uma camada de proteínas plasmáticas que irão mediar a resposta celular subsequente, uma vez que as células interagem com as proteínas e não com a superfície do implante diretamente (Puelo & Nanci, 1999; Davies, 2000). Em poucos minutos o

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

sangue extravasado sofre coagulação, ocorrendo ativação plaquetária, liberação de fatores de crescimento e formação de uma rede de fibrina, por onde, as células inflamatórias migrarão (Marco et al., 2005).

Os neutrófilos são as primeiras células a atingir o sítio do implante, mas em seguida os macrófagos tornam-se predominantes, sendo encontrados na interface osso-implante tanto nos momentos iniciais da cicatrização peri-implantar, como após a neoformação óssea (Park & Davies, 2000; Soskolne et al., 2002).

Os macrófagos são células que produzem uma miríade de moléculas entre elas, citocinas e quimiocinas que podem atuar no recrutamento de células osteoprogenitoras induzindo a neoformação óssea, ou induzir a reabsorção óssea (Champagne et al., 2002; Soskolne et al., 2002; Davies, 2003). As citocinas produzidas pelos macrófagos podem ter efeitos sobre diferentes tipos celulares ou vários efeitos diferentes sobre o mesmo tipo celular, podendo inclusive produzir efeitos antagônicos simultaneamente (Yamada et al., 2000).

Embora no passado, a presença de macrófagos ao redor dos implantes tenha sido considerada prejudicial à osseointegração, estudos recentes têm indicado um efeito benéfico dos

macrófagos no processo de formação óssea ao redor dos implantes (Refai et al., 2004; Marco et al., 2005). Contudo, o papel dos macrófagos na performance e longevidade dos implantes ainda não foi completamente esclarecido. Tendo em vista que variações na topografia do implante influenciam a adesão dos macrófagos e osteoblastos e podem influenciar a produção e a concentração dos fatores de crescimento no sítio peri-implantar, agindo como um bioreator (Schwartz & Boyan, 1994), a investigação do comportamento dessas células em contato com biomateriais tem sido cada vez mais abordada.

Após o contato com diferentes superfícies os macrófagos podem produzir fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina 1 (IL1), interleucina 6 (IL6), sendo também capazes de produzir citocinas anti-inflamatórias como fator de transformação de crescimento β (TGF β) (Wang et al., 1996) e interleucina 10 (IL10) (Gretzer et al., 2003), e sinais osteoindutores como a proteína morfogenética óssea 2 (BMP2), quando expostos a diferentes estímulos (Champagne et al., 2002; Watzek, 2004).

A exposição a diferentes biomateriais (Ciapetti et al., 2005) e a diferentes rugosidades de superfície (Rice et al., 2003) influencia a adesão e a liberação de citocinas em culturas de macrófagos, e supostamente, pode

influenciar na velocidade de neoformação óssea, ao ativar osteoblastos e células osteoprogenitoras (Tsutsui et al., 1999; Horowitz & Gonzalez, 1996; Davies, 2000). No entanto, não existem muitos estudos avaliando a interação entre macrófagos e titânio de diferentes rugosidades, *in vitro* e utilizando células humanas como modelo biológico.

Estudos *in vitro* utilizando cultura de células, constituem uma ferramenta útil na investigação dessas superfícies por permitirem uma análise detalhada das interações célula, matriz e superfície do implante (Lincks et al., 1998; Boyan et al., 2003; Bachle & Kohal, 2004). O comportamento de células de linhagens, imortalizadas, é diferente do comportamento de células humanas, obtidas a partir de culturas primárias, o que pode influenciar os diferentes resultados observados nos estudos relacionados às superfícies de implantes.

Variações na porosidade e rugosidade superficial do titânio influenciam o metabolismo celular e a liberação de citocinas e de fatores de crescimento, tanto em cultura de macrófagos (Spyrou et al., 2002), como de osteoblastos (Boyan et al., 2003; Rice et al., 2003). Não está esclarecido se a rugosidade de superfície é responsável pelas alterações celulares, ou se a adesão de macromoléculas do soro a essas

superfícies tratadas, modula o comportamento celular (Bachel & Kohal, 2004).

Para compreensão do mecanismo de formação óssea ao redor dos biomateriais é necessária a interação de conhecimentos quanto à superfície do material, perfil de citocinas e fatores de crescimento liberados pelas células nessas condições (Bachel & Kohal, 2004; Marco et al., 2005).

Os tratamentos de superfície, os quais resultam em modificações na topografia e até nas características químicas do titânio podem afetar não só as propriedades da superfície como a resposta celular para aquela superfície, sendo que a rugosidade de uma superfície pode ter efeito até maior que a própria composição química (Rosa & Beloti, 2003; Schmidt et al., 2003; Xavier et al., 2003).

Um desses efeitos seria influenciar a produção de citocinas pelas células mononucleares, dentre elas *Transforming Growth Factor β 1* ou TGF β 1. A superfamília de TGF β , como são chamadas as dúzias de moléculas sinalizadoras já descobertas e nomeadas a partir da primeira delas, o TGF β 1, possuem inúmeras funções já conhecidas como controle do desenvolvimento sexual, hormônios pituitários, surgimento de osso e cartilagem em mamíferos, e estão presentes em várias espécies. Os membros

dessa família são inicialmente produzidos como moléculas precursoras que vão sendo alteradas para formar a grande variedade de membros (Kingsley, 1994).

Uma grande fração da família TGF β tem a habilidade de induzir a formação óssea e de cartilagem quando injetadas sobre a pele ou no músculo de roedores por sua grande homologia com as BMPs. O TGF β 1, primeiro a ser descoberto dentre essas moléculas, apresenta atividade inibitória controlando proliferação e diferenciação em diversas células e tem efeito sobre a produção de outros fatores de crescimento. Existem estudos que sugerem que ele suprime, em condições normais, a reação imunológica (Kingsley, 1994).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi analisar a influência do tipo de tratamento de superfície do titânio no perfil de TGF β 1 produzido por mononucleares humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

Discos de titânio

Os discos de titânio utilizados nesta pesquisa foram produzidos e doados pela empresa Bicon (Boston, USA). Estes foram construídos em liga de titânio-alumínio-vanádio (Ti-6AL-4V), com 12mm de diâmetro e 4mm de altura, os

quais receberam três tipos de tratamentos de superfície denominados de S1, S2 e S3.

Os discos S1 foram obtidos a partir da usinagem do titânio, sendo comercialmente conhecidos como superfícies usinadas ou lisas sem tratamento adicional. Os discos S2 e S3 tiveram suas superfícies modificadas em relação aos discos S1, que por sua vez foram usados como controle. As superfícies S2 foram obtidas pela associação de jateamento com partículas de alumina, seguidas por ataque ácido, o que resultou em superfícies com rugosidade superficial em torno de 0,66 μ m. A superfície S3 recebeu o mesmo tratamento que a S2, seguido por uma deposição iônica de partículas de Ca e P em escala nanométrica (300-500 nm), resultando em superfícies bioativas com o mesmo padrão de rugosidade que a superfície S2. As três superfícies encontram-se disponíveis comercialmente e foram previamente caracterizadas por Coelho & Lemons (2009). A superfície S2 já caracterizaria um controle para a superfície S3, entretanto optou-se por usar S1 como controle, superfície já bastante conhecida e utilizada em vários estudos.

Cultura primária de células mononucleares obtidas de sangue periférico (PBMC)

Neste estudo, foram realizadas culturas primárias de células mononucleares (monócitos/macrófagos) humanas sobre a superfície de cpTi usinado e tratado, para dosagem de TGF β 1 dos sobrenadantes e determinação da viabilidade celular em função de tempo.

Foram utilizadas células mononucleares obtidas a partir de sangue periférico, colhido de indivíduo adulto, do sexo feminino, de aproximadamente 40 anos, mediante termo de consentimento previamente assinado e autorização do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Uberlândia (protocolo 046/06). Para obtenção dos mononucleares, foram colhidos 30 ml de sangue periférico de cada indivíduo, em tubos heparinizados (10 a 15 u/ml), o qual foi diluído em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) e distribuído em 6 tubos de 15 ml. Cada tubo contendo 11 ml de sangue diluído e 3 ml de meio para separação de linfócitos (Histopaque 1077 na densidade 1076 - Sigma Chemical Co, USA) foi centrifugado a 200 g, em temperatura ambiente, por 30 minutos.

Após a centrifugação, parte do sobrenadante (plasma) foi utilizada para condicionar os discos, restando 1,5 ml de

sobrenadante acima da “nuvem celular”, o qual foi coletado e transferido para tubo de centrífuga. Neste tubo foi acrescentada solução salina tamponada com fosfato (PBS) gelada e novamente centrifugado, a 1000 g por 10 minutos em centrífuga refrigerada (4°C). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado ressuspenso em 3 ml de meio DMEM (Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado com 10% SFB (Cultilab, São Paulo, Brasil), 50 μ g/ml de gentamicina (Gibco), 0.3 μ g/ml de fungizone (Gibco). A suspensão celular foi depositada sobre os discos S1, S2 e S3 no interior dos poços.

Uma alíquota da suspensão celular foi diluída 1:10 (v:v) em uma solução de Azul de Tripán (Sigma) 1% (v:v) em PBS estéril. A contagem das células viáveis foi realizada em hemocitômetro, com o auxílio de microscópio de luz.

Após a contagem celular, a suspensão foi distribuída sobre os discos de titânio (grupos S1, S2 e S3) em placas de cultivo de 24 poços, na concentração de 5×10^4 células/superfície e levada à estufa humidificada de CO₂ por 4 horas a 37°C.

Após esse período as placas foram centrifugadas a 200 g por 10 minutos e o sobrenadante aspirado para remoção das células não aderentes. Em seguida, cada poço recebeu DMEM completo e as células foram cultivadas em meio completo

a 37°C por 24 horas em câmara de CO₂ umidificada. Decorrido este período, os sobrenadantes foram colhidos e armazenados a -70°C até utilização.

Determinação do crescimento e viabilidade celular

Depois de completado o período de 24h, as placas contendo os discos foram submetidas ao teste de viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT-Formazan. De cada poço, foram removidos 1000 µl de meio, adicionados 50µl de substrato MTT na concentração de 5mg/ml. Em seguida as placas foram transferidas para a estufa de CO₂ onde permaneceram incubadas a 37°C por 4 horas tomando-se o cuidado de protegê-las da luminosidade. Após este período foi feita a dissolução dos cristais tendo cada poço recebido 500 µl de SDS e após 60 minutos, 100 µl de cada poço foi transferido para placas de 96 poços e a viabilidade determinada em leitor de microplacas a 570 nm.

Análise da morfologia celular ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Foi realizada análise morfológica descritiva das células do PBMC em 24 horas. O sobrenadante foi removido, os discos foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7.2) e

fixados em Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e formaldeído 2%, tamponados com cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4) por uma hora. Após esse período, o fixador foi removido, os discos desidratados em concentrações crescentes de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%) e transferidos para álcool absoluto. Após a desidratação, os discos foram secos até o ponto crítico de 40°C (Polaron, UK), receberam 3 ciclos de cobertura de ouro-paládio no metalizador (Emitech, ISI, Kent, England) e foram analisados ao MEV (Hitachi 3500N, USA).

Dosagem de TGFβ1 no sobrenadante da cultura de PBMC

Os sobrenadantes provenientes das placas contendo os discos S1, S2 e S3 foram coletados no período de 24h e armazenados à 70°C negativos. Após a coleta, os sobrenadantes foram divididos em alíquotas, as quais foram utilizadas para dosagem de TGFβ1 através de Elisa Sanduíche. Foi estabelecido o período de maior concentração dessa citocina em função do tempo e da superfície onde as células mononucleares foram cultivadas. Para tanto, foi utilizado o kit-comercial e-Bioscience (San Diego, CA, USA), conforme recomendação do fabricante.

Resumidamente, o procedimento consistiu em sensibilização da microplaca de 96 poços com 50 µl de anticorpo de captura para TGFβ1, incubação com as

amostras por 18 horas a 4°C, lavagem em solução de PBS-Tween a 0,5 % e bloqueio com 100 µl de solução de bloqueio por 2 horas à temperatura ambiente (albumino-soro-bovina). Foi feita então nova incubação com 50 µl de uma mistura do anticorpo de detecção conjugado a biotina e avidina-peroxidase, e após 90 minutos revelou-se a 37°C. Para isso, as placas foram novamente lavadas e adicionado substrato enzimático (tetrametilbenzidina e 0.03% de H₂O₂ . TMB), incubado por 15 minutos. A reação foi interrompida com H₃PO₄ a 1M.

A densidade óptica de cada poço foi determinada através de um leitor automatizado em um comprimento de onda de 450 nm. A concentração correspondente a cada valor de densidade ótica (D.O.) obtido foi determinada por comparação com a curva-padrão. A sensibilidade de detecção de TGFβ1 foi 60 pg/ml.

Análise estatística

Para análise estatística, foram aplicados teste de normalidade aos dados obtidos e o teste de não paramétrico de Kruskal-Wallis para análises múltiplas (p<0,05).

RESULTADOS

Viabilidade e adesão celular

A influência das superfícies na viabilidade celular foi avaliada usando um ensaio colorimétrico baseado na atividade mitocondrial – MTT, e expressa como níveis de absorbância. Em 24 horas, não foram detectadas diferenças significativas nos níveis de absorbância das células mononucleares (p>0.05, Figura 1) cultivadas sobre as três superfícies.

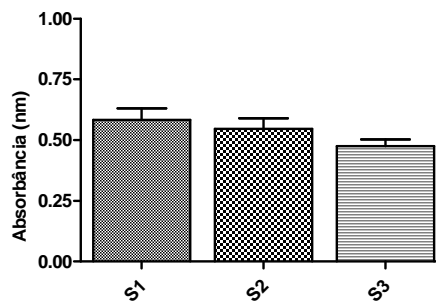


Figura 1: Níveis de absorbância das células mononucleares cultivadas nas diferentes superfícies (S1, S2 e S3) em 24 horas (p>0,05).

Análise morfológica ao Microscópio Eletrônico de Varredura

Foram obtidas, por meio de microscopia de varredura, imagens das três superfícies previamente à cultura de PBMC (Figura 2) e 24h após a mesma (Figuras 3 e 4). As imagens foram utilizadas para avaliação morfológica qualitativa das células mononucleares aderidas sobre as três superfícies de titânio. Em 24 horas a população de mononucleares aderidas sobre a superfície apresentou grande heterogeneidade em

relação à morfologia, sobretudo no grupo S1, onde foram observadas células com numerosas extensões citoplasmáticas associadas a alguns ninhos de células redondas e menores (Figuras 3A e 4A). As células dos grupos S2 (Figuras 3B e 4B) e S3 (Figuras 3C e 4C) apresentaram-se menos espalhadas que no grupo S1.

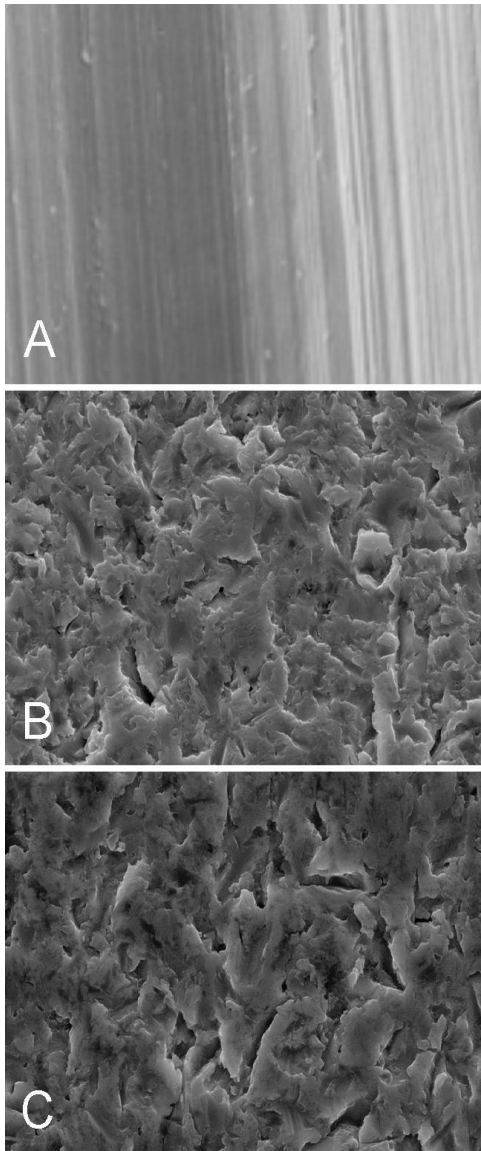


Figura 2: Superfícies S1 (A), S2 (B) e S3 (C) antes do uso na cultura de PBMC.

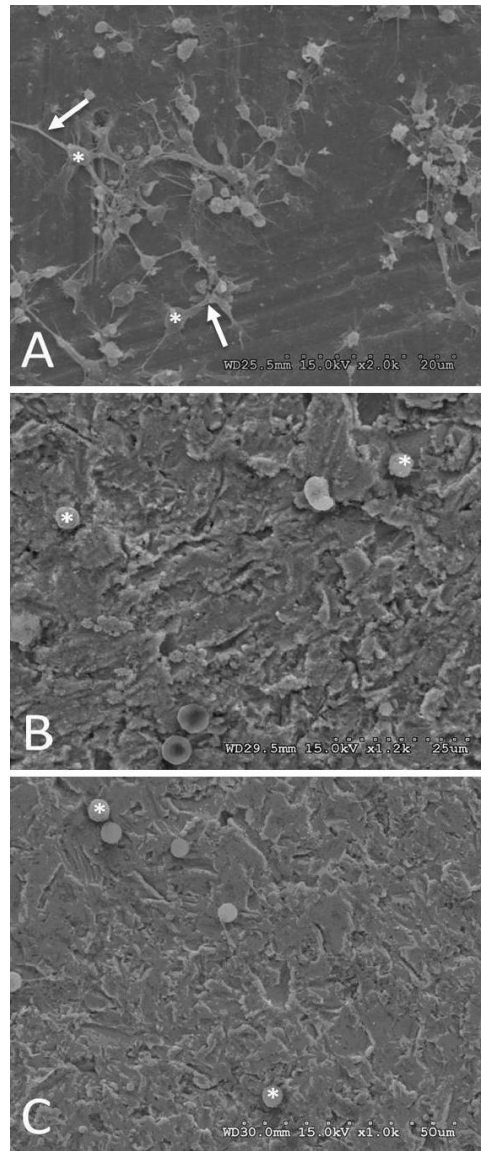


Figura 3: Células mononucleares (A, B, C) sobre as superfícies S1 (A), S2 (B) e S3 (C) no período de 24 horas. (→) indicam prolongamentos citoplasmáticos e (*) indicam células esféricas. Ampliação descrita em cada foto.

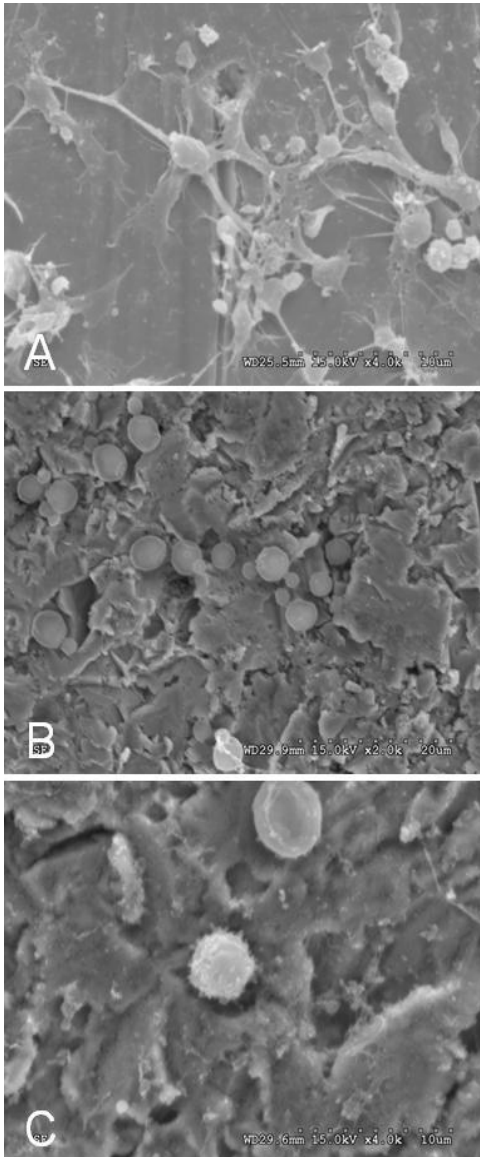


Figura 4: Células mononucleares (A, B, C) sobre as superfícies S1 (A), S2 (B) e S3 (C) no período de 24 horas. Ampliação descrita em cada foto.

Quantificação dos níveis de TGF β 1 nas culturas de células mononucleares (PBMC)

Neste estudo foram quantificados os níveis de TGF β 1 em culturas de células mononucleares. Na cultura de PBMC, as diferentes superfícies avaliadas não interferiram nos níveis de TGF β 1 produzidas em 24 horas e ($p > 0,05$; Figura 5).

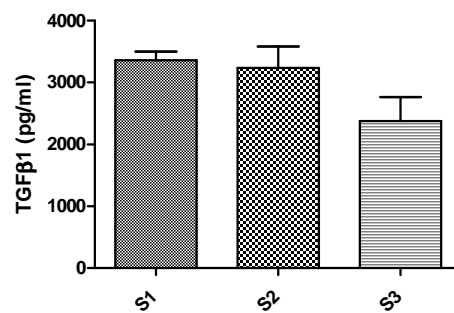


Figura 5: Níveis de TGF β 1 em cultura de células mononucleares cultivadas nas diferentes superfícies (S1, S2 e S3) após 24 horas.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, várias pesquisas confirmaram a influência da rugosidade de superfície sobre a resposta dos osteoblastos (Mustafa et al., 2001; De Oliveira & Nanci, 2004; Sader et al., 2005; De Oliveira et al., 2007), apresentando resultados favoráveis para as superfícies com micro ou nanotopografia (Boyan et al., 2003; Li et al., 2004; Zinger et al., 2005; De Oliveira et al., 2007). No entanto,

poucos estudos (Rice et al., 2003; Vallés et al., 2008) avaliaram o efeito das modificações na superfície do titânio sobre a resposta de outras células importantes no processo de reparo, como as mononucleares (Curran et al., 2005).

No presente estudo, foi analisada a interação de células mononucleares do sangue periférico humano “aderentes”, principalmente monócitos/macrófagos, com três superfícies de titânio disponíveis comercialmente, as quais diferem entre si pelo tipo de tratamento que receberam (S1, S2 e S3). Para isso, foram obtidas amostras de sangue de voluntários sadios, separadas por gradiente de centrifugação. Estudos prévios usando metodologia similar (Suska et al., 2005) mostraram uma pureza de monócitos de 60-70% usando separação por Percoll, com linfócitos constituindo as células remanescentes.

Embora não tenha sido realizada quantificação de mononucleares por métodos de imunolocalização ou Facs, no presente estudo foram utilizadas modificações metodológicas para aumentar o número de monócitos na fração de mononucleares. Para isto, as células do PBMC foram incubadas em CO₂ humidificado, centrifugadas e lavadas em HBSS. Esse método foi previamente proposto por Wang et al. (1996) e Soskolne et al. (2002), resultando em mais

de 90% de macrófagos entre as células aderentes (Wang et al., 1996).

No atual estudo, era desejável que se obtivesse a maior número possível de monócitos, buscando mimetizar as fases iniciais de reparo da ferida após a inserção do implante, nas quais, células sanguíneas incluindo plaquetas, mononucleares, polimorfonucleares e leucócitos são as primeiras a entrar em contato com a superfície (Soskolne et al., 2002) liberando compostos que levam às fases subsequentes do reparo da ferida (Refai et al., 2004).

Linhagens de macrófagos têm sido utilizadas em modelos para estudar a interação entre superfícies de titânio e mononucleares. Apesar dos benefícios de se trabalhar com linhagem de macrófagos bem estabelecida, células mononucleares obtidas de sangue periférico humano (cultura primária) são as mais próximas das condições clínicas de um implante.

Estudos prévios demonstraram que a interação célula-superfície e sua resposta variam em função do tipo de célula utilizada nos experimentos (Salthouse, 1984; Suska et al., 2005) e que macrófagos provenientes de linhagem não apresentam o mesmo comportamento que culturas primárias obtidas de humanos ou roedores (Davies, 2000).

Atraídos por mediadores solúveis liberados no local do reparo da ferida,

conhecidos como quimiocinas, os monócitos permanecem no sítio peri-implantar, aderem à superfície do implante com diferenciação em macrófagos, que por sua vez liberam mediadores como óxido nítrico, citocinas e quimiocinas (Soskolne et al., 2002; Refai et al., 2004).

Esse perfil de citocinas produzido pelos macrófagos pode, por sua vez, contribuir para o processo de reparo ósseo (Soskolne et al., 2002; Refai et al., 2004). Essa suposição tem estimulado pesquisas em relação aos efeitos da característica da superfície do biomaterial sobre o perfil dos mediadores liberados pelos macrófagos (Gretzer et al., 2003; Soskolne et al., 2002).

Alguns estudos têm demonstrado que as superfícies com recobrimento de Ca e P, como a S3, podem ativar macrófagos, induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, retardando o processo de reparo (Silva et al., 2003).

Tendo em vista que adesão e proliferação são os primeiros eventos observados após o contato célula-superfície, esses parâmetros foram avaliados na cultura de mononucleares. Como observado por outros investigadores, a rugosidade e a composição química das superfícies não influenciaram na viabilidade celular (Refai et al., 2004; Rice et al., 2003) e apresentaram valores próximos aos detectados na superfície

usinada (controle), demonstrando a biocompatibilidade das superfícies.

Estudos anteriores demonstraram a importância da adesão celular de macrófagos (Gretzer et al., 2003; Refai et al 2004; Vallés et al 2008; Ciapetti et al 2005) nas etapas que seguem o processo de reparo. No presente estudo não foram encontradas diferenças entre as superfícies, no número de PBMC aderidas em 24 horas. Estes resultados diferem dos observados por Salthouse (1984) e Refai et al. (2004), os quais encontraram variações nas taxas de adesão dos macrófagos em função da rugosidade e composição química da superfície. Resseti (2005), em estudo utilizando mononucleares obtidos da medula óssea, verificou que essas células, sobretudo a população de monócitos, apresentam boa adesão após 72 horas, e que os procedimentos realizados no preparo das amostras para análise ao microscópio podem levar ao desprendimento das células, o que pode ter influenciado nossos resultados.

Além da importância das superfícies nas interações celulares que conduzem aos eventos de adesão, proliferação e produção de proteínas relacionadas à mineralização, avaliações das alterações na morfologia das células também podem contribuir na compreensão dos efeitos das superfícies sobre os mononucleares. Dessa forma, o atual

estudo optou por realizar análise da morfologia celular ao microscópio eletrônico de varredura, tendo observado que a superfície S1 (usinada) induziu alterações na morfologia dos mononucleares, as quais acompanharam as ranhuras da superfície.

Citocinas como TGF β , liberadas frente a agressões provenientes de procedimentos cirúrgicos, como a instalação de implantes, podem influenciar na velocidade do processo de reparo. Neste contexto, foi avaliada a interação célula-implante por meio da liberação de TGF β 1 pelas células mononucleares.

Durante os estágios iniciais de formação óssea, a ação da TGF β 1 é recrutar e estimular a proliferação de células osteoprogenitoras (Davies, 2000; Hughes et al., 2006). No entanto, segundo Kanaan e Kanaan (2006), efeitos divergentes de TGF β 1 na formação óssea têm sido descritos *in vivo* e *in vitro*, dependendo das condições experimentais, das células empregadas e do estágio de maturação das mesmas.

No presente estudo, a produção de TGF β 1 pelas células mononucleares não foi influenciada significativamente pelas três superfícies. Embora o método Elisa Sanduíche seja o mais utilizado para quantificar as citocinas produzidas por macrófagos, esse método apresenta limitações, pois não permite dosar

quantidades pequenas, sendo muitas vezes necessário estimular os macrófagos com lipopolissacarídeos (Kishida et al., 1996), o que não foi feito nesse estudo a fim de se obter resultados mais fiéis ao efeito das modificações de superfície sobre as células.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que o tipo de superfície analisada não interferiu na viabilidade celular e apenas a superfície S1 induziu modificações na morfologia das células mononucleares. Além disso, o perfil da produção de TGF β 1 não seguiu um padrão em função das superfícies nas quais as células foram cultivadas.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, agência financiadora do projeto, e ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica à aluna da graduação Cláudia Carolina Lopes Moura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBREKTSSON, T. Osseointegração antecedentes históricos e conceitos atuais. In: LINDHE, J. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap. 28, p. 623-630.

AMARANTE, E. S.; LIMA, L. A. DE. Otimização das superfícies dos implantes: plasma de titânio e jateamento com areia condicionado por ácido – estado atual. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, v. 15(2), p. 166-173, 2001.

BACHEL, M.; KOHAL, R. J. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation on protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clinical Oral Implant Research*. v. 15, n. 6, p. 683-692, Dec. 2004.

BOYAN, B. D.; LOSSDÖRFER, S.; WANG, L.; ZHAO, G.; LOHMANN, C. H.; COCHRAN, D. L.; SCHWARTZ, Z. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *European Cells and Materials Journal*, v. 6, p. 22-27, 2003.

BRUNETTE, D.M.; CHEHROUDI, B. The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behaviour *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Biomechanical Engineering*., v. 121, n.1, p.49-57, Feb. 1999.

CHAMPAGNE, C.M.; TAKEBE, J.; OFFENBACHER, S.; COOPER, L.F. Macrophage cells lines produces

osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone*, v.30, n.1, p. 26-31, Jan. 2002.

CIAPETTI, G.; GONZÁLEZ-CARRASCO, J.L.; SAVARINO, L.; MONTEALEGRE, M.A.; PAGANI, S.; BALDINI, N. Quantitative assessment of the response of osteoblast-and macrophage like cells to particles of Ni-free Fe-base alloys. *Biomaterials*, v.26, n.8, p.849-859, March 2005.

COELHO, P.G.; GRANJEIRO, J.M.; ROMANOS, G.E.; SUZUKI, M.; SILVA, N.R.; CARDAROPOLI, G.; THOMPSON, V.P.; LEMONS, J.E. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research part B Applied Biomaterials*. v. 88, n. 2, p. 579-96, Feb. 2009 A.

COELHO, P.G.; LEMONS, J.E. physico/chemical characterization and *in vivo* evaluation of nanothickness bioceramic depositions on alumina-blasted/acid-etched ti-6al-4v implant surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research part A*., v. 90, n. 2, p. 351-61, Aug. 2009.

COELHO, P.G.; SUZUKI, M.; GUIMARAES, M.V.; MARIN, C.;

GRANATO, R.; GIL, J.N.; MILLER, R.J.
Early Bone Healing around Different
Implant Bulk Designs and Surgical
Techniques: A Study in Dogs. *Clinical
Implant Dentistry and Related Research.*
[Epub ahead of print] May 2009.

CURRAN, J.M.; GALLAGHER, J.A.;
HUNT, J.A. The inflammatory potential of
biphasic phosphate granules in
osteoblast/macrophage co-culture.
Biomaterials, v. 26, n.26, p. 5313-20, Sep.
2005.

DAVIES, J.E. *Bone Engineering*. Toronto:
Em Squared Inc., 2000. 656 p.

DAVIES, J.E. Understanding peri-implant
endosseous healing. *Journal of Dental
Education*, v. 67, n. 8, p. 932-949, 2003.

DE OLIVEIRA, P.T.; NANCI, A.
Nanotexturing of titanium-based surfaces
upregulates expression of bone sialoprotein
and osteopontin by cultured osteogenic
cells. *Biomaterials*, v. 25, n. 3, p. 403-13.,
Feb. 2004.

DE OLIVEIRA, P.T.; ZALZAL S.F.,
BELOTI, M. M., ROSA, A. L., NANCI,
A. Enhancement of *in vitro* osteogenesis
on titanium by chemically produced
nanotopography. *Wiley InterScience*, v.
80, n. 3, p. 554-564, March 2007.

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. 7-8, p. 665-671, 2005.

GRETZER, C.; GISSELFÄLT, K.;
LILJENSTEN, E.; RYDÉN, L.;
THOMSEN, P. Adhesion, apoptosis and
cytokine release of human mononuclear
cells cultured on degradable poly (urethane
urea), polystyrene and titanium *in vitro*.
Biomaterials, v. 24, n. 17, p. 2843-2852,
Aug. 2003.

HOROWITZ, S.M.; GONZALES, J.B.
Inflammatory response to implant
particulates in a macrophage/osteoblast
coculture model. *Calcified Tissue
International*. v. 59, n. 5, p. 392-6, Nov.
1996.

HUGHES, F.J.; TURNER, W.;
BELIBASAKIS, G.; MARTUSCELLI, G.
Effects of growth factors and cytokines on
osteoblast differentiation. *Periodontoly
2000.*, v. 41, p.48-72, 2006.

HUNT, T.K. Basic principles of wound
healing. *Journal of Trauma*, v.30, p.122-
128, 1990.

KANAAN, R.A.; KANAAN, L.A. Transforming growth factor beta1, bone connection. *Medical Science Monitor*. 12(8):RA164-9, Aug. 2006.

KINGSLEY, D.M. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes and Development*. v. 8, p. 133-146, 1994.

KISHIDA, A.; KATO, S.; OHMURA, K.; SUGIMURA, K.; AKASHI, M. Evaluation of biological responses to polymeric biomaterials by RT-PCR analysis. I. Study of IL-1 beta mRNA expression. *Biomaterials*, v. 17, n. 13, p. 1301-5, July 1996.

LEMONS, J.E. Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants. *Journal of Oral Implantology*., v. 30, n. 5, p.318-24, 2004.

LI, L.H.; KONG, Y.M.; KIM, H.W.; KIM, Y.W.; KIM, H.E.; HEO, S.J; KOAK, J.Y. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. *Biomaterials*, v. 25, n. 14, p. 2867-75, June 2004.

LINCKS, J.; BOYAN, B. D.; BLANCHARD, C. R.; LOHMANN, C.

H.; LIU, Y.; COCHRAN, D. L.; DEAN, D. D.; SCHWARTZ, Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium an titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*, v. 19, n. 23, p. 2219-2232, 1998.

MARCO, F.; MILENA, F.; GIANLUCA, G.; VITTORIA, O. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron*, v. 36, p. 630-644, 2005.

MENDES, V. C., MOINEDDIN R., DAVIES, J.E. Discrete calcium phosphate nanocrystalline deposition enhances osteoconduction on titanium-based implant surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 90 A, n. 2, p. 577-585, June 2008.

MUSTAFA, K.; WENNERBERG, A.; WROBLEWSKI, J.; HULTENBY, K.; LOPEZ, B.S.; 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. *Clinical Oral Implants Research*., v. 12, n. 5, p.515-25, Oct. 2001.

NAGEM FILHO, H.; FRANCISCONI, P. A. S.; CAMPI JÚNIOR, L.; FARES, N. H. Influência da textura superficial dos

implantes. *Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS*, v. 22, n. 55, p. 82-86, 2007.

PARK, J.Y.; DAVIES, J.E. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, v. 11, p.530-539, 2000.

PUELO, D.A.; NANCI, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*, v. 20, n. 23-24, p. 2311-21, Dec. 1999.

REFAI, A.K.; TEXTOR, M.; BRUNETTE, D.M.; WATERFIELD, J.D. Effect of titanium surface of topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. *Journal of Biomedical Materials Research part A*, v. 70, n. 2, p. 194-205, Aug. 2004.

RESSETTI, A. P. A.; BUCHI, D. F. *Ação in vitro do medicamento homeopático canova em medula óssea de camundongos*. Dissertação (mestrado), Universidade Federal do Paraná, 2005.

RICE, J.M.; HUNT, J.A.; GALLAGHER, J.A.; HANARP, P.; SUTHERLAND, D.S.; GOLD, J. Quantitative assessment of the response of primary derived osteoblasts and macrophages to a range of

nanotopography surfaces in a single culture model *in vitro*. *Biomaterials*, v. 24, n. 26, p. 4799-818, Nov. 2003.

ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. *Brazilian Dental Journal*, v. 14, n.1, p. 16-21, 2003.

SADER, M. S.; BALDUINO, A.; SOARES, G. DE A.; BOROJEVIC, R. Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation. *Clinical Oral Implants Research*, v. 16, n. 6, p. 667-675, 2005.

SALTHOUSE, T.N. Some aspects of macrophage behavior at the implant interface. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 18, n. 4, p. 395-401, April 1984.

SAMMONS, R. L.; 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. *Clinical Oral Implants Research*, v. 16, p. 657-666, 2005.

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, p. 4191-4196, 2003.

SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B.D. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 56, p. 340-347, 1994.

SILVA, S.N.; PEREIRA, M.M.; GOES, A.M.; LEITE, M.F. Effect of biphasic calcium phosphate on human macrophage functions *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research part A*, v. 65, n. 4, p.475-81, June 2003.

SIMON, Z.; WASTON, P.A. Biomimetic dental implants-news ways to enhance osseointegration. *Journal of the Canadian Dental Association*, v. 68, n. 5, p. 286-8, May 2002.

SOSKOLNE, W.A.; COHEN, S.; SENNERBY, L.; WENNERBERG, A.; SHAPIRA, L. The effect of titanium surface roughness on adhesion of monocytes and their secretion of TNF α and PGE₂. *Clinical Oral Implant Research*, v. 13, n. 1, p. 86-93, Feb. 2002.

SPYROU, P.; PAPAIOANNOU, S.; HAMPSON, G.; BRADY, K.; PALMER, R.M.; MCDONALD, F. Cytokine release by osteoblast-like cells cultures on implant discs of varying alloy compositions. *Clinical Oral Implant Research*, v. 13, n. 6, p. 623-630, Dec. 2002.

SUSKA, F., GRETZER, C., ESPOSITO, M., TENGVALL, P. AND THOMSEN, P. Monocyte viability on titanium and copper coated titanium. *Biomaterials*, v. 26, n. 30, p. 5942-5950. Oct. 2005.

TSUTSUI, T.; KAWAGUCHI, H.; FUJINO, A.; SAKAI, A.; KAJI, H.; NAKAMURA, T. Exposure of macrophage like cells to titanium particles does not affect bone resorption, but inhibits bone formation. *Journal of Orthopaedic Science*, v. 4, n. 1, p.32-38, 1999.

VALLÉS, G.; GIL-GARAY, E.; MUNUERA, L.; VILABOA, N. Modulation of the cross-talk between macrophages and osteoblasts by titanium-based particles. *Biomaterials*, v. 29, n. 15, p. 2326-35, May 2008.

WANG, J.Y.; WICKLUND, B. H.; GUSTILO, R. B.; TSUKAYAMA, D. T. Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokines by human

monocytes/macrophages *in vitro*.
Biomaterials, v. 17, n. 23, p. 2233-2240,
Dec. 1996.

WATZEK, G. *Implants in Qualitatively
compromised bone*. São Paulo:
Quintessence Publishing Co, Inc., 2004.
181p.

XAVIER, S. P.; CARVALHO, P. S. P.;
BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Response
of rat bone marrow cells to commercially
pure titanium submitted to different
surface treatments. *Journal of Dentistry*, v.
31, n. 3, p. 173-80, March 2003.

YAMADA, M.; SUZU, S.; TANAKA-
DOUZONO, M.; WAKIMOTO, N.;
HATAKE, K.; HAYASAWA, H.;
MOTOYOSHI, K. Effect of cytokines on
the proliferation/differentiation of stroma-
initiating cells. *Journal of Cellular
Physiology*, v.184, p. 351-355, Sep. 2000.

ZINGER, O.; ZHAO, G.; SCHARTZ, Z.;
SIMPSON, J.; WIELAND, M.;
LANDOLT, D.; BARBARA, B.
Differential regulation of osteoblasts by
substrate microstructural features.
Biomaterials, v. 26, p. 1837-1847, 2005.