



Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e
Clínica Integrada
ISSN: 1519-0501
apesb@terra.com.br
Universidade Federal da Paraíba
Brasil

Bastos ALVES, Luciana; GINANI, Fernanda; Pereira da SILVA, José Sandro; ALVES-JÚNIOR, Clodomiro; Galvão BARBOZA, Carlos Augusto
Adesão de Células do Ligamento Periodontal de Ratos a Diferentes Superfícies de Titânio: Estudo Comparativo In Vitro
Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, vol. 11, núm. 4, octubre-diciembre, 2011,
pp. 519-523
Universidade Federal da Paraíba
Paraíba, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63722200011>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

Adesão de Células do Ligamento Periodontal de Ratos a Diferentes Superfícies de Titânio: Estudo Comparativo *In Vitro*

Adhesion of Ligament Periodontal Cells to Different Titanium Surfaces: An *In Vitro* Comparative Study

Luciana Bastos ALVES¹, Fernanda GINANI², José Sandro Pereira da SILVA³, Clodomiro ALVES-JÚNIOR⁴,
Carlos Augusto Galvão BARBOZA⁵

¹Mestre em Odontologia pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal/RN, Brasil.

²Aluna do curso de graduação em Biomedicina. Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal/RN, Brasil.

³Professor Adjunto do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal/RN, Brasil.

⁴Professor Titular do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal/RN, Brasil.

⁵Professor Adjunto do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal/RN, Brasil.

RESUMO

Objetivo: o presente estudo teve como objetivo avaliar, através de experimentos *in vitro* utilizando cultura celular, a capacidade de adesão das células do ligamento periodontal de ratos sobre as superfícies de titânio polidas e tratadas por nitretação iônica (plasma).

Método: foram utilizados discos de titânio grau II ASTM F86 nas dimensões de 15mm de diâmetro por 1,5mm de espessura, os quais receberam diferentes tratamentos de superfície em 2 grupos distintos: polido e nitretado a plasma por gaiola catódica. As células foram isoladas do ligamento periodontal de ratos e cultivadas em meio de cultura α -MEM contendo antibióticos e suplementado com 10% de FBS, por 72 horas, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C. No subcultivo as células foram cultivadas sobre os discos de titânio em uma placa de 24 poços, na densidade de 1×10^4 células por poço, incluindo-se controles positivos sem os discos de titânio. Após 24 horas de cultivo, as células foram submetidas à contagem em câmara de Neubauer.

Resultados: os resultados mostraram que a média de adesão celular foi maior na superfície controle ($0,62 \pm 0,22$) do que nos grupos polido ($0,46 \pm 0,14$) e nitretado ($0,33 \pm 0,10$). Foi observada diferença estatisticamente significante entre os grupos controle e nitretado ($p=0,04$), porém não se observou diferença na adesão celular entre os grupos polido e nitretado.

Conclusão: a capacidade de adesão das células do ligamento periodontal de rato a superfícies de titânio não sofreu influência do tratamento de superfície dado ao material.

ABSTRACT

Objective: the present study aims to evaluate, through experiments *in vitro*, the adhesion capacity of rats periodontal ligament cells on polishing and treated by ionic nitriding (plasma) titanium surfaces.

Method: degree II titanium discs (ASTM F86), 15mm of diameter for 1,5mm of thickness, which had received different treatments from surface in 2 distinct groups (polished and cathodic cage plasma nitriding) were used. The cells were isolated from periodontal ligament of rats and cultivated in α -MEM contend antibiotic and supplemented with 10% of FBS, for 72 hours, in humid atmosphere with 5% of CO₂ at 37°C. In the subculture the cells were cultivated on titanium discs in 24-well cell culture plates, with a density of 1×10^4 cells per well, including wells with no discs (control). After 24 hours of cultivation, the cells were counted in a Neubauer chamber.

Results: the results had shown that the mean adhesion was greater on the control surface ($0,62 \pm 0,22$) than on polished ($0,46 \pm 0,14$) and nitriding ($0,33 \pm 0,10$) surfaces. Statistical significant difference was observed between the groups control and cathodic cage plasma nitriding ($p=0,04$), nevertheless no difference was found between polished and nitriding groups.

Conclusion: the adhesion capacity of rat periodontal ligament cells on the titanium surfaces was not influenced by the different surface treatments given to the material, since none of these contributed positively in the process of cellular adhesion.

DESCRITORES

Ligamento periodontal; Adesão celular; Titânio.

KEY-WORDS

Periodontal ligament; Cell adhesion; Titanium.

INTRODUÇÃO

As características do ligamento periodontal proporcionam muitos benefícios na interface entre o osso e superfície dos dentes naturais. A possibilidade da presença do ligamento periodontal entre o osso e a superfície do implante dentário poderia trazer grandes vantagens, uma vez que o implante se comportaria como um dente natural¹.

Logo após a inserção do implante inicia-se o processo de cicatrização tecidual. Sabe-se que as células residentes no ligamento periodontal são capazes de formar cimento e promover a inserção de novas fibras colágenas sobre superfícies radiculares expostas² e que, se por qualquer razão as células do ligamento periodontal também forem incluídas no processo de cicatrização após a colocação do implante de titânio no osso, há possibilidade de formação de cimento e ligamento periodontal em torno dos implantes³⁻⁸.

Estudos experimentais têm demonstrado que alterações nas características superficiais do titânio podem influenciar a resposta biológica ao redor do biomaterial e, como consequência, o sucesso da interação célula-superfície^{9,10}. Na busca por superfícies que contribuam para essa interação e supram a necessidade de obter uma boa adesão, e consequentemente uma maior proliferação e formação tecidual, várias pesquisas têm sido desenvolvidas, modificando estas superfícies por variados processos¹¹⁻¹³.

Dentre estes, destaca-se a nitretação iônica ou nitretação por plasma, que consiste em ionizar um gás ou mistura gasosa contendo nitrogênio, através de uma descarga luminescente gerada por uma diferença de potencial entre a amostra (cátodo) e o ânodo, em uma atmosfera a baixa pressão. Os íons produzidos no plasma são acelerados em direção à amostra, chocando-se com ela e fornecendo energia suficiente para aquecer-lá até a temperatura de nitretação¹⁴. O conceito básico no uso da nitretação iônica para melhorar as propriedades superficiais de uma liga de titânio é fundamentado na possibilidade de formar nitretos ou carbetas abaixo da superfície da liga. Os nitretos e carbetas de titânio são materiais duros que melhoram as propriedades tribológicas da superfície, ou seja, aumentam a resistência ao desgaste e a dureza superficial¹³, favorecendo a adesão e proliferação celular à superfície do material. Estes achados foram comprovados em estudos *in vitro* utilizando células pré-osteoblásticas MC3T3¹² e Osteo-1^{15,16}.

Considerando que a nitretação a plasma, assim como outros tratamentos de superfície, influencia o processo de interação célula-superfície, o presente estudo buscou avaliar a capacidade de adesão das células do ligamento periodontal de ratos às superfícies de titânio polidas (P) e nitretadas por plasma (N).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN (parecer 102/08) e foi dividido em duas etapas. Primeiramente foi realizado o preparo das amostras através do tratamento de superfície das placas de titânio. Em seguida foi realizado um ensaio *in vitro* com células isoladas do ligamento periodontal de ratos e cultivadas sobre as placas de titânio tratadas e poços sem discos de titânio como controle positivo do crescimento celular (superfície plástica).

Preparo das amostras

As amostras de titânio foram preparadas segundo protocolo previamente estabelecido¹⁷. Em seguida foram esterilizadas por radiação gama (dose 25 kGy), liberada a uma dose média de 8,993 kGy/h (2h 46 minutos a uma distância de 50mm), em irradiador GAMMACELL 220 Excel (MDS Nordion, Ca).

Obtenção e cultivo das células do ligamento periodontal de ratos

Para obtenção do ligamento periodontal dois ratos albinos, machos, saudáveis, da linhagem Wistar com quatro meses de idade, pesando aproximadamente 250 gramas, foram sacrificados com dose letal de anestésico (Ketamina) administrado por via intramuscular. Os animais foram dissecados para remoção dos incisivos em uma câmara de fluxo laminar e sob condições assépticas, segundo protocolo estabelecido¹⁸. Os dentes foram imediatamente mantidos em um meio básico α-MEM contendo 50 mg/L de Sulfato de Gentamicina e 2 mg/L de Anfotericina B (Cultilab, Brasil).

O ligamento periodontal foi removido através de raspagem delicada da superfície radicular com o uso de uma lâmina de bisturi e encubado em solução de tripsina/EDTA (0,25% de Tripsina contendo 1 mM de EDTA – Cultilab/Brasil) por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado o meio α-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino – FBS (Cultilab, Brasil) com o objetivo de inativar a tripsina. A suspensão foi centrifugada a 1200 rpm durante 8 minutos e sobrenadante retirado, as células ressuspensas e cultivadas.

As células foram cultivadas em poços de placas de cultura contendo o meio básico α-MEM suplementado com 10% de FBS. As culturas foram mantidas a 37°C em 5% de CO₂ até atingirem 70 – 90% de confluência, com troca de meio a cada 3 dias.

Cultivo nos discos de Titânio

As células do ligamento periodontal foram cultivadas em placas de 24 poços (TTP®), na densidade de 1×10^4 células por poço. Foram utilizados 12 discos de titânio, 6 de cada grupo (polido e nitretado). A mesma densidade celular foi cultivada em seis poços sem disco, tendo a superfície plástica de poliestireno como controle positivo.

Viabilidade e Adesão celular

superfícies de titânio (grupo polido e grupo nitretado) e à superfície de plástico (grupo controle), no período de 24 horas após o plaqueamento. O número de células colhidas de cada poço foi obtido pela contagem de células viáveis através do uso da câmara de Neubauer e o método da exclusão de células coradas pelo Azul de Trypan, obedecendo-se a seguinte equação matemática: Número total de células contadas x diluição x 10^4 / Número de quadrados da Câmara de Neubauer usados para contagem.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise não paramétrica. As diferenças entre os grupos foram comparadas pelo teste Mann Whitney U, sendo considerado estatisticamente significante um valor de $p<0.05$.

RESULTADOS

A comparação da adesão de células do ligamento periodontal de ratos às três superfícies distintas mostrou que a média de adesão foi maior na superfície controle (Tabela 1). Quando os grupos foram comparados entre si, foi observada diferença estatisticamente significante entre as superfícies controle e nitretado. Não foi encontrada diferença estatística quando se comparou a superfície controle (C) com o grupo polido (P) e na comparação entre o grupo polido (P) e o grupo nitretado (N).

Tabela 1. Análise da adesão de células do ligamento periodontal de ratos às diferentes superfícies estudadas.

Células do ligamento periodontal	
	Média ± dp
Controle (C)	0,62 ± 0,22 ^{a,b}
Polido (P)	0,46 ± 0,14 ^{a,c}
Nitretado (N)	0,33 ± 0,10 ^{b,c}

^a $p=0,12$; ^b $p=0,04$; ^c $p=0,21$ (Mann Whitney U)

DISCUSSÃO

A literatura revela que o ligamento periodontal é uma fonte autógena de células indiferenciadas, com capacidade de expansão e habilidade de se diferenciarem em vários tipos celulares¹⁹. Um estudo com ligamento periodontal humano²⁰ demonstrou que as células-tronco deste tecido mantém a capacidade proliferativa mesmo após terem sido submetidas a um protocolo de criopreservação, o que amplia a potencialidade do seu uso em processos de regeneração tecidual, associadas a biomateriais.

O implante dentário é aceito amplamente e está consolidado como um recurso precioso na reabilitação

em mais de 90% dos casos²¹. Entretanto, evidências de formação do ligamento periodontal ao redor dos implantes dentários têm sido investigadas em estudos *in vivo* e *in vitro*.

Um estudo piloto investigou a capacidade de células do ligamento periodontal de cães formarem uma nova inserção do ligamento periodontal quando utilizadas sobre a superfície de implantes de titânio⁸. Os espécimes com células cultivadas foram implantados nas mandíbulas dos cães e, após três meses de cicatrização, o exame histológico revelou uma camada com tecido semelhante ao cimento, com inserção de fibras colágenas em algumas superfícies dos implantes. Estes resultados demonstraram que as células estudadas podem formar tecidos semelhantes a um verdadeiro ligamento periodontal ao redor do titânio.

A formação de cimento com inserção de fibras também foi demonstrada em experimentos utilizando implantes de titânio com uma superfície áspera. Implantes foram colocados em contato com raízes de dentes naturais em modelo *in vivo* e parte das superfícies dos implantes foi mantida em contato com as raízes retidas, enquanto outra parte manteve contato ósseo. Os resultados revelaram que alguns dos implantes foram envolvidos por uma camada de cimento com inserção de fibras ao redor de suas superfícies. Células originárias do ligamento periodontal de raízes retidas migraram para a superfície do implante e formaram um novo ligamento periodontal interposto em ambas as interfaces titânio-oso e titânio-dentina⁴. Outros estudos *in vivo* semelhantes também utilizaram o contato com dentes, raízes residuais ou germes dentários como fonte de células do ligamento periodontal através da migração para as superfícies de titânio^{5,6}. A capacidade de adesão, proliferação e diferenciação destas células contribui para a formação de um selamento biológico entre os implantes e os tecidos adjacentes⁹.

No presente experimento foi analisada a capacidade de adesão *in vitro* das células do ligamento periodontal de ratos a superfícies de titânio polidas e nitretadas a plasma. A superfície plástica de poliestireno foi usada como controle positivo da adesão celular, pois é superfície padrão no cultivo de células. Os resultados mostraram diferença estatística apenas entre as superfícies controle (C) e nitretada a plasma (T) ($p=0,04$), o que poderia sugerir que a superfície polida (P) teve melhores resultados de adesão das células do ligamento periodontal, como visto na literatura (3,22-24). A adesão celular é uma das etapas mais importantes na interação com o biomaterial, uma vez que a qualidade desta irá influenciar a morfologia e a capacidade de proliferação e diferenciação da célula²⁵.

Estudos que avaliaram as características da superfície do titânio^{26,27} atribuíram a adesão osteoblastos-biomaterial especialmente à molhabilidade e à superfície hidrofílica, que permite melhores condições para a adesão celular quando comparadas à superfície hidrofóbica. A avaliação de superfícies de titânio nitretadas a plasma¹², seguindo o mesmo

superfícies com características hidrofílicas, o que favorece os eventos celulares iniciais, facilitando a adesão e proliferação celular.

A análise estatística dos resultados de adesão celular entre as superfícies polida (P) e nitretada (T), não mostrou diferença entre os grupos ($p=0,021$), o que pode sugerir que o tratamento de superfície utilizado no presente estudo não teve influência sobre a adesão de células do ligamento periodontal de ratos. Estes resultados diferem de outros estudos encontrados na literatura que compararam o efeito de várias superfícies de titânio e observaram que os melhores resultados foram encontrados nas superfícies texturizadas^{28,29}, incluindo também os que utilizaram o mesmo tipo de tratamento – nitretação iônica^{12,15,16,30}. Todavia, é importante considerar que estes estudos foram realizados com linhagens celulares imortalizadas que exibem potencial para expressar características fenotípicas de osteoblastos.

Estudos posteriores avaliando a capacidade de diferenciação de células obtidas do ligamento periodontal em contato com o titânio poderão contribuir para a compreensão do processo de osseointegração; além disso, estudos moleculares para avaliar os tipos de ligações envolvidos na adesão, poderão ser importantes para esclarecer o mecanismo pelo qual as células se ligam às diferentes superfícies.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente experimento sugeriram que a adesão células do ligamento periodontal de ratos às superfícies dos discos de titânio foram similares à superfície controle, porém não se observou diferença na adesão celular entre os grupos polido e nitretado. Assim, conclui-se que os tratamentos utilizados nas superfícies de Ti não influenciaram positivamente a capacidade de adesão desse tipo de célula estudado.

REFERÊNCIAS

- Jahangiri L, Hessamfar R, Ricci JL. Partial generation of periodontal ligament on endosseous dental implants in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16(4):396-401.
- Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984; 11(8):494-503.
- Cochran DL, Simpson J, Weber HP, Buser D. Attachment and growth of periodontal ligament cells on smooth and rough titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994; 9(3):289-97.
- Buser D, Warrer K, Karring T. Formation of periodontal ligament around titanium implants. *J Periodontol* 1990; 61(9):597-601.
- Warrer K, Karring T, Gotfredsen K. Periodontal ligament formation around different types of dental titanium implants. I. 6. Piattelli A, Cordioli GP, Passi P, Trisi P. Formation of dental hard tissues and periodontal ligament around titanium implants after tooth bud injury: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994; 9(4):417-21.
- Parlar A, Bosshardt DD, Unsal B, Cetiner D, Haytaç C, Lang NP. New formation of periodontal tissues around titanium implants in a novel dentin chamber model. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16(3):259-67.
- Choi BH. Periodontal ligament formation around titanium implants using cultured periodontal ligament cells: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; 15(2):193-6.
- Lumbikanonda N, Sammons R. Bone cell attachment to dental implants of different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16(5):627-36.
- Shibata Y, Hosaka M, Kawai H, Miyazaki T. Glow discharge plasma treatment of titanium plates enhances adhesion of osteoblast-like cells to the plates through the integrin-mediated mechanism. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17(6):771-7.
- Silva MAM, Martinelli AE, Alves Jr C, Nascimento RM, Távora MP, Vilar CD. Surface modification of Ti implants by plasma oxidation in hollow cathode discharge. *Surf Coat Technol* 2006; 20(8):2618-26.
- da Silva JS, Amico SC, Rodrigues AO, Barboza CA, Alves C Jr, Croci AT. Osteoblastlike cell adhesion on titanium surfaces modified by plasma nitriding. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011; 26(2):237-44.
- Yilbas BS, Sahin AZ, Al-Garni AZ, Said SAM, Ahmed Z, Abdulaleem BJ, et al. Plasma nitriding of Ti-6Al-4V alloy to improve some tribological properties. *Surf Coat Technol* 1996; 80(3):287-92.
- O'Brien JM, Goodman D. Plasma (ion) nitriding. In: ASM International Handbook Committee, editors. *ASM Handbook: Heat Treating*. Utah: International Library Service, 1991. p.420-4.
- Guerra Neto CLB, da Silva MAM, Alves Jr C. In vitro study of cell behavior on plasma surface modified titanium. *Surface Engineering* 2009; 25(2):146-50.
- Sá JC, de Brito RA, Moura CE, Silva NB, Alves MBM, Alves Jr C. Influence of argon-ion bombardment of titanium surfaces on the cell behavior. *Surf Coat Technol* 2009; 203(13):1765-70.
- Alves Jr C, de Araújo FO, Ribeiro KJB, da Costa JAP, Souza RRM, de Sousa RS. Use of cathodic cage in plasma nitriding. *Surf Coat Technol* 2006; 201(6):2450-4.
- Akizuki T, Oda S, Komaki M, Tsuchioka H, Kawakatsu N, Kikuchi A, et al. Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs. *J Periodontal Res* 2005; 40(3):245-51.
- Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976; 47(5):256-60.
- Vasconcelos RG, Ribeiro RA, Vasconcelos MG, Lima KC, Barboza CA. In vitro comparative analysis of cryopreservation of undifferentiated mesenchymal cells derived from human periodontal ligament. *Cell Tissue Bank*. 2011. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s10561-011-9271-3
- Schroeder A, van der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reaction of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg* 1981; 9(1):15-25.
- Lange R, Lüthen F, Beck U, Rychly J, Baumann A, Nebe B. Cell-extracellular matrix interaction and physicochemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. *Biomol Eng* 2002; 19(2-6):255-61.
- Huang HH, Ho CT, Lee TH, Lee TL, Liao KK, Chen FL. Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. *Biomol Eng* 2004; 21(3-5):93-7.

- 2007; 86(A).
25. Stiehler M, Lind M, Mygind T, Baatrup A, Dolatshahi-Pirouz A, Li H, et al. Morphology, proliferation, and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on titanium, tantalum, and chromium surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2008; 86(2):448-58.
 26. Lampin M, Warocquier-Clérout, Legris C, Degrange M, Sigot-Luizard MF. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *J Biomed Mater Res* 1997; 36(1):99-108.
 27. Ponsonnet L, Reybier K, Jaffezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behavior. *Mater Sci Eng* 2003; 23:551-60.
 28. Anselme K, Bigerelle M, Noël B, Iost A, Hardouin P. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *J Biomed Mater Res* 2002; 60(4):529-40.
 29. Sena LA, Rocha NCC, Andrade MC, Soares GA. Bioactivity assessment of titanium sheets electrochemically coated with thick oxide film. *Surf Coat Technol* 2003; 166(2-3):254-8.
 30. Tavares JC, Cornélio DA, da Silva NB, de Moura CE, de Queiroz JD, Sá JC, et al. Effect of titanium surface modified by plasma energy source on genotoxic response in vitro. *Toxicology* 2009; 262(2):138-45.

Recebido/Received: 10/11/2010

Revisado/Reviewed: 19/07/2011

Aprovado/Approved: 30/08/2011

Correspondência:

Carlos Augusto Galvão Barboza
Universidade Federal do Rio Grande do Norte -
Departamento de Morfologia
Av. Salgado Filho, 3000
Campus Universitário, Lagoa Nova – Natal/RN
CEP: 59072-970
Telefone: (84) 32153431
E-mail: cbarboza@cb.ufrn.br