

Cultura de células na Implantologia Oral: revisão da literatura

Cells culture in Oral Implantology: review of literature

Leonardo Jorge Carvalho Teixeira*
Carlos Magno dos Anjos*
Márcio Macedo Soares*
Guaracilei Maciel Vidigal Jr.**
Márcio Baltazar Conz***

RESUMO

Diversos estudos se concentram na pesquisa de biomateriais que permaneçam implantados no corpo humano de maneira satisfatória e por períodos mais longos. Considerável progresso vem ocorrendo no conhecimento dos mecanismos básicos da formação da interface entre o tecido ósseo e o biomaterial e o seu efeito na formação óssea. A cultura de células é um dos métodos empregados para estudar o comportamento celular e sua interação com as superfícies dos biomateriais no que se refere à toxicidade, adesão, proliferação e função. No entanto, estes testes são, em geral, estáticos e não conseguem reproduzir a dinâmica e a biodiversidade que um biomaterial fica sujeito quando inserido dentro de um organismo vivo. O objetivo do presente estudo foi realizar uma revisão de literatura sobre a cultura de células e sua relação com a Implantologia Oral.

Unitermos - Cultura de células; Osteoblastos; Biomateriais; Implante dentário.

ABSTRACT

Several studies have focused on the research of biomaterials that remain satisfactorily, long-term implanted in the human body. Considerable progress has occurred on the understanding of basic mechanisms regarding bone tissue-biomaterial interfaces, and their effect on bone formation as well. Cells culture is one of the methods used to study the cellular component and its interaction with biomaterial surfaces related to toxicity, attachment, proliferation, and function. However, these tests are usually static and cannot reproduce the dynamics and biodiversity that a biomaterial is prone when inserted into a living organism. The purpose of this study was to perform a literature review on the subject and their implications for oral implantology.

Key Words - Cells culture; Osteoblasts; Biomaterials; Dental implants.

* Mestrando em Implantologia Oral – Unigranrio.

**Doutor em Engenharia de Materiais e coordenador do curso de Mestrado em Implantologia Oral – Unigranrio.

***Doutor em Engenharia de Materiais e professor do curso de Mestrado em Implantologia Oral – Unigranrio.

Introdução

Os avanços alcançados na Medicina e Odontologia têm possibilitado o desenvolvimento de técnicas e novos biomateriais que proporcionam uma melhor qualidade de vida. Paralelamente, o aumento da expectativa de vida tem demandado o projeto de biomateriais para aplicações biomédicas que permaneçam implantados no corpo humano de maneira satisfatória e por períodos mais longos.

A pesquisa laboratorial na Odontologia abrange uma grande variedade de áreas e modelos, incluindo pesquisas com animais, micro-organismos, materiais inorgânicos, tecidos e células humanas. Os temas variam desde a busca por uma vacina contra a cárie dental até o isolamento de células-tronco para a neoformação de tecidos mineralizados como ossos e dentes¹.

Entretanto, existe um longo caminho entre o desenvolvimento de um novo biomaterial ou técnica até a utilização em seres humanos. Para utilização na clínica, é mandatório que os materiais e técnicas sejam testados *in vitro* e *in vivo*¹.

A maior parte dos estudos *in vitro* relacionados à interação célula/biomaterial utiliza cultura de células osteoblásticas. A interação com o meio biológico depende dos estímulos e distúrbios bioquímicos que o biomaterial induz e, ao mesmo tempo, como esse material implantado responde química e fisicamente, ao ambiente biológico².

O objetivo do presente estudo foi realizar uma revisão da literatura sobre a cultura de células e sua relação com a Implantação Oral.

Revisão da Literatura

Cultura de células - metodologia de cultivo e análises

A cultura de células é um dos métodos empregados para estudar as células vivas e elucidar os mecanismos fundamentais da biologia celular³.

O primeiro passo para obtenção de uma cultura de células é o isolamento das células de um único tipo, de um tecido que contém uma mistura de células. Esse processo é iniciado com o rompimento da matriz extracelular que mantém essas células unidas, seguido de técnicas de dissociação e separação dos diferentes tipos de células⁴.

Uma vez que uma população uniforme de células foi obtida, ela pode ser utilizada diretamente para análises bioquímicas ou como material de início para cultura de células.

Dadas às condições apropriadas, a maioria das células animais pode viver, multiplicar e mesmo expressar propriedades diferenciadas em uma placa de cultura de tecidos. Diferentemente

das bactérias, as células de um tecido sadio não estão adaptadas para viver em suspensão e requerem uma superfície sólida para crescer e se multiplicar⁴.

O meio de cultivo de tecidos é composto de aminoácidos essenciais, vitaminas, glicose, sais e proteínas (como insulina, transferrina e fatores de crescimento, necessários em meios quimicamente definidos, livres de soro). Outras substâncias também utilizadas são os antibióticos (usualmente, penicilina e estreptomicina) que suprimem o crescimento de bactérias e o vermelho de fenol que é um corante indicador de pH cuja cor é monitorada para assegurar um pH neutro em torno de 7,4.

As culturas normalmente crescem em recipientes de plástico ou vidro com uma superfície carregada negativamente que permite a adesão das células. Os recipientes são geralmente mantidos em uma incubadora a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de atmosfera úmida⁴.

No que diz respeito às células utilizadas nos cultivos, seria adequado utilizar culturas primárias, ou seja, aquelas obtidas diretamente dos tecidos de um organismo, pois estas são as células com as quais os pilares vão interagir quando implantados². Por esta razão, células de cálcia de ratos recém-nascidos e de medula óssea de ratos e humanos (células-tronco mesenquimais adultas ou pré-osteoblastos, precursores de osteoblastos envolvidos no reparo ósseo) têm sido empregadas em estudos de biocompatibilidade de vários biomateriais⁵⁻⁶. No teste em cultura de células é observado basicamente como células mantidas em cultura interagem com as superfícies.

Estes experimentos analisam o efeito do material sobre as células, no que se refere à adesão, multiplicação, função e toxicidade. Desta forma, dependendo do momento da análise, podem ser realizadas avaliações celulares qualitativas como a análise da morfologia celular, formações de fibras de tensão e contatos focais e avaliações quantitativas, como a eficiência de adesão, o espriamento celular, a proliferação, a diferenciação, a densidade de células ao longo da interface e a execução de uma função específica como a formação de depósitos extracelulares mineralizados. Com relação à toxicidade, há uma variedade de métodos de avaliação. No entanto, os materiais não tóxicos *in vitro* não são necessariamente biofuncionais, o que torna necessária a realização de outros testes de caracterização biológica⁶⁻⁹.

Cultura de células em biomateriais

Implantes dentários

Implantes dentais são confeccionados a partir do titânio comercialmente puro devido à suas propriedades biológicas, permitindo que ocorra o contato direto do tecido ósseo com a sua superfície. Este material é biocompatível tanto *in vitro* quanto

in vivo, possui resistência à corrosão, durabilidade, baixo peso e pode ser preparado de diferentes formas e texturas¹⁰⁻¹².

A cultura de células proporciona acesso a informações moleculares e celulares que estimulam as abordagens no campo da Engenharia nanoestrutural para o desenho de implantes e hipóteses significantes para serem testadas *in vivo*².

Os eventos celulares que ocorrem na interface entre o osso e o implante são importantes para o entendimento da osseointegração. A resposta das células e tecidos na interface com o implante é dependente das propriedades de superfície como a composição química, energia de superfície, topografia e rugosidade do implante¹³⁻¹⁴.

Os eventos celulares que ocorrem na interface entre o osso e o implante são importantes para o entendimento da osseointegração. A resposta das células e tecidos na interface com o implante é dependente das propriedades de superfície como a composição química, energia de superfície, topografia e rugosidade do implante¹³⁻¹⁴.

Para que ocorra a osteogênese a partir das células osteoblásticas, é necessária uma sequência de eventos envolvendo o recrutamento de células osteoprogenitoras, adesão e proliferação, seguida pela expressão do fenótipo osteoblástico. Desta forma poderá ocorrer a produção de uma matriz de colágeno extracelular mineralizada na interface^{12,15}.

As características de superfície, como macro e microtopografia e composição química, afetam as respostas celulares a curto prazo como a migração e a adesão celular, bem como a diferenciação e expressão da matriz mineralizada¹⁶.

Um estudo avaliou o efeito da cristalinidade de recobrimentos com hidroxiapatita (HA) na biossolubilidade, eficiência da adesão e proliferação celular *in vitro* e indicou que a topografia e a química da superfície com menor cristalinidade foi favorável à adesão celular. No entanto, o teste de biossolubilidade indicou que a HA com 97% de cristalinidade gerou um menor impacto sobre o meio de cultura e pH, enquanto que a HA com 25% e a HA com 63% de cristalinidade elevaram significativamente o pH do meio até 8,2 e 7,75, respectivamente. Um elevado pH do meio resultou em um efeito citotóxico que inibiu a proliferação das células inseridas nas superfícies recobertas¹⁷.

Outro estudo analisou a influência de uma estrutura de titânio poroso sobre o comportamento de células osteogênicas humanas. Pastilhas porosas de titânio foram fabricadas com po-

ros medindo entre 50 µm e 400 µm e com porosidade de 60%. Após 17 dias de cultivo, os resultados indicaram que o titânio poroso é um substrato apropriado para a adesão de células osteogênicas, proliferação e produção de uma matriz mineralizada. A promoção de um ambiente tridimensional foi considerada um substrato vantajoso para uma desejável interação entre o osso e a superfície do implante¹⁸.

Estratégias para a otimização da osseointegração têm sido criadas e se concentram na associação das propriedades do titânio poroso na indução do crescimento tecidual e em tratamentos de superfície que demonstrem potencial osteogênico seja na produção de uma nanotopografia ou na imobilização de moléculas específicas com conhecida atividade osteogênica¹⁹.

Substitutos ósseos

A utilização de substitutos ósseos na Odontologia apresentou um grande avanço nas últimas décadas com o desenvolvimento de biomateriais para o tratamento de aumento ou reconstrução do rebordo alveolar, preenchimento de defeitos intraósseos periodontais e de alvéolos dentais, elevação do assoalho do seio maxilar e tratamento de

defeitos peri-implantares.

Inicialmente os estudos *in vitro* sobre a interação entre os osteoblastos e o biomaterial eram essencialmente preocupados com o efeito da resposta celular a diversos tipos de materiais, com pouca atenção sendo dada a influência da caracterização físico-química da superfície. As propriedades extrínsecas dos biomateriais possuem um papel crítico no estabelecimento da interface entre a célula e o biomaterial, e as condições de manufatura afetam as propriedades de superfície das hidroxiapatitas²⁰⁻²¹.

A reatividade superficial é uma característica comum dos substitutos ósseos bioativos e possui impacto na adesão, proliferação, diferenciação e mineralização das células ósseas. A adesão ao tecido ósseo e a progressiva formação óssea são o resultado de múltiplas, paralelas e sequenciais reações que ocorrem na interface entre as células e o biomaterial²².

Ao investigar o efeito de cinco biomateriais com diferentes características físico-químicas (Bio-Oss, Algipore, Bio-Base, Osteograf, PepGen P-15) utilizados como substitutos ósseos no modelo de crescimento e proliferação de células ósseas derivadas do osso ilíaco medular humano, concluiu-se que, *in vitro*, os osteoblastos humanos demonstraram diferentes padrões de proliferação de acordo com o biomaterial utilizado²³.

Um estudo observou *in vitro* a adsorção de proteína (albumina) e a adesão de células precursoras de osteoblastos em

discos de hidroxiapatitas (HA) com diferentes cristalinidades. Após mistura e prensagem de pó de hidroxiapatita 100% cristalina (HA100) com outra amorfa (HA0) que serviram como grupos controle, os autores obtiveram: HA70 (com 70% de cristalinidade), HA50 (com 50% de cristalinidade) e HA30 (com 30% de cristalinidade). A dissolução da HA foi dependente da cristalinidade, com uma maior dissolução de fósforo à medida que se diminuía a cristalinidade. Não houve diferenças estatisticamente significantes na adsorção de albumina e na adesão celular entre os grupos HA0, HA30, HA50 e HA70; no entanto, uma significativa diminuição na adsorção e na adesão foi observada na HA100²⁴.

Outros autores avaliaram a diferenciação em osteoblastos de células mesenquimais oriundas da medula óssea de ratos cultivados sobre pastilhas de hidroxiapatita com diferentes topografias de superfície (5%, 15% e 30% de microporosidade) com o intuito de observar a adesão celular, proliferação, quantidade de proteína total, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e formação de nódulos mineralizados. Os eventos celulares iniciais (adesão) não foram afetados pela topografia da superfície da hidroxiapatita. Entretanto, os eventos intermediários e finais (proliferação, quantidade de proteína total, ALP e formação de nódulos mineralizados) foram favorecidos em superfícies com uma topografia mais regular, como aqueles presentes nas pastilhas de hidroxiapatita com 5% ou 15% de microporosidade. Proteínas plasmáticas, como por exemplo, a fibronectina, desempenham um importante papel na diferenciação osteoblástica, portanto superfícies mais regulares como aquelas com 5% e 15% de microporosidade favoreceram a adsorção seletiva destas proteínas resultando em maior diferenciação osteoblástica⁶.

Discussão

Desde que a adesão direta do osso a biomateriais foi primeiramente observada, considerável progresso tem ocorrido no conhecimento dos mecanismos básicos da formação da interface entre o osso e o biomaterial e seu efeito na formação óssea. No entanto, duas abordagens vêm sendo alvo de estudos, uma enfatizando o estudo da interface entre o osso e o biomaterial que é desenvolvida *in vivo* e outra utilizando imersões *in vitro* em fluidos fisiológicos simulados e meios de cultura celulares²⁵⁻²⁷.

No estudo dos implantes dentais, por exemplo, fatores como posição anatômica das fixações (maxila *versus* mandíbula), comprimento do dispositivo, carga (direção e intensidade), fadiga e

Desde que a adesão direta do osso a biomateriais foi primeiramente observada, considerável progresso tem ocorrido no conhecimento dos mecanismos básicos da formação da interface entre o osso e o biomaterial e seu efeito na formação óssea. No entanto, duas abordagens vêm sendo alvo de estudos, uma enfatizando o estudo da interface entre o osso e o biomaterial que é desenvolvida in vivo e outra utilizando imersões in vitro em fluidos fisiológicos simulados e meios de cultura celulares²⁵⁻²⁷.

desgaste do material, alterações no meio e no biomaterial e idade do paciente, são considerações que não podem ser realizadas *in vitro*. Adicionalmente, os modelos de cultura de células tendem a examinar a resposta de tipos simples de células, geralmente linhagens transformadas e, portanto, devem ser interpretados com cautela.

Estudos sistemáticos, realizados em animais ou utilizando culturas de células, fornecem continuamente informações com relação à relevância das propriedades da superfície e desempenho biológico dos implantes²⁸.

Diferentes métodos de preparação da superfície do implante, como por exemplo, as técnicas de texturização (anodização, jateamento de micropartículas, ataque ácido) podem afetar significativamente as propriedades resultantes da superfície e, conseqüentemente, a resposta biológica das células osteoblásticas incluindo a adesão celular, a proliferação e a atividade funcional. É interessante ressaltar que, revestimentos biocerâmicos em escala nanométrica parecem beneficiar a topografia e a química da superfície, resultando em um aumento da sua osteocondutividade^{29,31}.

A identificação de características das superfícies que influenciam as interações com as células e com os microconstituintes dos fluidos corporais tem sido realizada através dos testes *in vitro*. Embora a avaliação de como um biomaterial se comporta *in vivo* não possa ser completamente realizada através dos resultados de uma análise *in vitro*, essas técnicas fornecem informações valiosas e apresentam vantagens como a possibilidade de se isolar a variável de superfície específica, rapidez, simplicidade, reprodutibilidade, quantificação e custo. A limitação principal é a dificuldade de reproduzir a biodiversidade que um biomaterial fica sujeito quando inserido dentro de um organismo vivo.

Alguns autores consideraram como vantagens dos testes

Conclusão

in vitro a possibilidade do sistema ser reproduzido em sequência de eventos bem determinados, a possibilidade do isolamento de variáveis, a possibilidade de utilização de métodos de avaliação da adesão, proliferação e diferenciação, o fato das células poderem crescer em áreas relativamente extensas fornecendo bastante material para análise e ainda por se tratarem de experimentos que apresentam curto período de avaliação e demandam menores custos operacionais. Como desvantagens, estão: a ausência da resposta inflamatória, neovascularização e interação com outros tipos de células, a ausência das forças biomecânicas existentes *in vivo*, e a necessidade dos meios de cultura requererem suplementos, que possam alterar o comportamento das células, mascarando os resultados³⁰.

Após a revisão da literatura pode-se concluir que as informações obtidas através de cultura de células são importantes para verificar o comportamento biológico das células e tecidos sobre os biomateriais. Os resultados obtidos são importantes como uma etapa preliminar à realização dos testes *in vivo*. Os testes *in vitro* são, em geral, estáticos e não levam em consideração a dinâmica e biodiversidade do biomaterial *in vivo*.

Recebido em: jun/2009

Aprovado em: ago/2009

Endereço para correspondência:

Leonardo Jorge Carvalho Teixeira

leojorgeteixeira@hotmail.com

Referências bibliográficas

- Luiz RR, Costa AJL, Nadanovsky P. Epidemiologia e bioestatística na pesquisa odontológica. São Paulo: Editora Ateneu; 2005.
- Cooper LF, Masuda T, Yliheikkilä PK, Felton DA. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:163-74.
- De Robertis EMF, Hib J. Bases da biologia celular e molecular. 4a Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. Artmed 4ª Edição; Porto Alegre: Artmed; 1999.
- De Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 2004;25:403-13.
- Rosa LA, Beloti MM, Noort RV. Osteoblastic differentiation of cultured rat bone marrow cells on hydroxyapatite with different surface topography. *Dent Mater* 2003;19:768-72.
- ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: In vitro methods. International Organization for Standardization. Geneva; 1999.
- Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000;21:667-81.
- Dos Santos EA, Farina M, Soares GA, Anselme K. Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cell behavior. *J Biomed Mater Res A* 2009 May; 89(2):510-20.
- Williams DF. *Fundamental aspects of biocompatibility*. Edited by DF Williams (CRC Press, Boca Haton, Florida, 1981) p.9.
- Brånemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent* 1983;50:399-410
- Diniz MG, Soares GA, Coelho MJ, Fernandes MH. Surface topography modulates the osteogenesis in human bone marrow cell cultures grown on titanium samples prepared by a combination of mechanical and acid treatments. *J Mat Sci: Mat Med* 2002;13:421-32.
- Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 1996;17:137-46.
- Thomas KA, Cook SD. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J Biomed Mater Res* 1985;19:875 -901
- Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirilys YF. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials* 2001;22:87-96.
- Keller JC, Stanford CM, Wightman JP, Draughn RA, Zaharias R. Characterizations of titanium implant surfaces. III. *J Biomed Mater Res* 1994;28:939-46.
- Chou L, Marek B, Wagner WR. Effects of hydroxyapatite coating crystallinity on biocompatibility, cell attachment efficiency and proliferation in vitro. *Biomaterials* 1999;20:977-85.
- Rosa AL, Crippa GE, de Oliveira PT, Taba M Jr, Lefebvre L-P, Beloti MM. Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. *Clin Oral Impl Res* 2009;20:472-81.
- De Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res* 2007;80:554-64.
- Anselme K, Biggerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J Biomed Mater Res* 2000;49:155-66.
- Conz MB, Granjero JM, Soares GA. Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatite for medical-dental applications as bone graft. *J Appl oral Sci* 2005;13:136-40.
- Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 1999;20:2287-303
- Kübler A, Neugebauer J, Oh JH, Scheer M, Zöller JE. Growth and Proliferation of Human Osteoblasts on Different Bone Graft Substitutes. *An In Vitro Study Implant Dent* 2004;13:171-9.
- Yang Y, Dennison D, Ong JL. Protein Adsorption and Osteoblast Precursor Cell Attachment to Hydroxyapatite of Different Crystallinities. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:187-92.
- Hench L, Splinter R, Greenlee T, Allen W. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Eng* 1971;2:117-41.
- Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass ceramic. *J Biomed Mater Res* 1990;24:721-34.
- El-Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM. Formation of surface reaction products on bioactive glass and their effects on the expression of the osteoblastic phenotype and the deposition of mineralized extracellular matrix. *Biomaterials* 1997;18:295-303.
- Heller MA, Howe LN. *Handbook of Biomaterials Evaluation*. USA: Taylor & Francis;1999. vol. 49, p.759.
- Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992;7:302-10.
- Masuda T, Yliheikkilä PK, Felton DA, Cooper LF. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part I. In vivo studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:17-29.
- Coelho PG, Granjero JM, Romanos GE, Suzuki M, Silva NR, Cardaropoli G et al. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;88(2):579-96.