

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ADESÃO DE FIBROBLASTOS
NIH3T3 ESTIMULADOS POR bFGF EM DISCOS DE TITÂNIO**

Autor

Camilo Santos Thaddeu

Orientador

Maria Antonieta Lopes de Souza

Co-orientador

Virgínia Minghelli Schmitt

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular como requisito para a
obtenção do grau de Mestre

Porto Alegre, Fevereiro de 2008.

Agradecimentos:

Este trabalho é resultado de muitas horas de dedicação e esforço de uma grande equipe, que sofreu, suportou e no fim vibrou com a vitória de um grande time. Muito obrigado às minhas dedicadas e pacientes orientadoras, ao meu irmão, meu pai e minha mãe e em especial à minha esposa Daniela.

Índice:

Resumo.....	1
Absctract.....	2
1- Revisão de literatura.....	3
1.1- Implantes osseointegrados de titânio e osseointegração.....	3
1.2- Implantes dentários.....	4
1.3- Zona de interface entre implante e tecidos receptores.....	5
1.4- Características histológicas e clínicas do sítio receptor.....	6
1.5- Superfícies dos implantes.....	10
1.6- Relação da superfície do titânio com os tecidos moles.....	11
1.7- Influência dos fatores de crescimento nos tecidos periimplantares.....	13
1.8- Fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF).....	15
1.9- Hipótese.....	16
1.10- Justificativa.....	16
1.11- Objetivos.....	17
1.11.1- Gerais.....	17
1.11.2- Específicos.....	17
2- Artigo científico.....	18
3- Considerações finais.....	29
1.2. Referências Bibliográficas.....	32

Resumo

Uma conexão estável entre a superfície de titânio e os tecidos a sua volta é um dos mais importantes pré-requisitos para o sucesso a longo prazo dos implantes. Para isso, uma forte e efetiva adesão das células na superfície do biomaterial é requerida.

O objetivo desse estudo foi o de avaliar a adesão de fibroblastos estimulados por Fator de Crescimento de Fibroblastos básico (bFGF) em discos de titânio. Para esse estudo foram produzidos 30 discos de titânio com superfície lisa. Esses discos foram colocados em placas de cultura e sobre eles foi inserido meio com fibroblastos NIH3T3, estimulados por bFGF, no grupo teste e sem este fator de crescimento no controle. As amostras foram obtidas em 3 horas, 24 horas e 48 horas. Foram obtidas 10 imagens com Microscópio Eletrônico de Varredura em cada disco, totalizando 300 micrografias. Como resultado foi encontrado uma diferença significativa no crescimento de fibroblastos nos três tempos deste experimento, do grupo onde o bFGF foi administrado.

Abstract

A estable connection between the titanium surface and the surrounding tissue is the most important prerequisites for the long-term success of implants. Therefore, a strong adhesion of the cells on biomaterial surface is required.

The objective of this study was to evaluate fibroblast adhesion stimulated by basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) on titanium discs. For this study 30 titanium discs with smooth surface were produced. These discs were placed on culture plates with NIH3T3 fibroblasts, stimulated by bFGF, on test group and without the growth factor on control group. The samples were obtained after 3 hours, 24 hours and 48 hours. Using SEM, 10 images were obtained from each disc, totalizing 300 micrografies. The test showed that there are more fibroblasts attached to titanium discs, with a significative difference, at all experimental analysed periods of this experiment, when bFGF was administrated.

1-REVISÃO DE LITERATURA

1.1-Implantes Osseointegrados de titânio e osseointegração

Segundo Adell et al.¹, os implantes dentários representaram, para a odontologia um grande avanço na reabilitação do edentulismo parcial e total. A reposição de peças dentárias por meio de uma raiz artificial que pode sustentar uma prótese, gerou uma expectativa positiva de impacto psicossocial aos pacientes que até o momento eram reabilitados com próteses removíveis sustentadas total ou parcialmente por mucosa bucal. De acordo com Locker², a reabilitação com implantes osseointegrados é capaz de melhorar a capacidade mastigatória e a satisfação dos pacientes que receberam próteses suportadas por implantes ou com apoio nos implantes e na mucosa bucal.

Adell et al.¹ conceituaram osseointegração como sendo o contato íntimo e direto de osso vital com estruturas de titânio, que apresentam acabamento e geometria definidos. Para que a osseointegração ocorra é importante que ela seja precedida por uma técnica cirúrgica delicada, por um período de cicatrização adequado e pela distribuição pertinente do estresse, quando colocado em função mastigatória.

De acordo com Albrektsson et al.³, os primeiros estudos sobre implantes osseointegrados foram apresentados por Branemark na década de 70, mostrando um acompanhamento de 10 anos de pacientes desdentados que receberam reabilitação com próteses fixas suportadas por implantes osseointegrados. Baseados nesses estudos os autores concluíram que a osseointegração é um método que permite a ancoragem direta do implante ao osso, e, sobre os implantes, podem ser construídas próteses dentais, que são conectadas através de pilares intermediários, peças estas que fazem a ligação do implante colocado intraósseo com a cavidade oral. As estruturas mais superficiais do implante e o pilar são

circundados por tecido mole que atua como barreira funcional importante para o sucesso clínico ao longo do tempo ^{4,5,6,7,8,9,10}.

Além das funções reabilitadoras, os implantes osseointegrados possuem a propriedade de manter a função, forma e volume ósseo nas regiões onde estiverem instalados, pois desempenham a função de estimular a produção de matriz óssea calcificada podendo muitas vezes aumentar a densidade óssea na região onde foi inserido o implante. Segundo Davies¹¹, os implantes atuam na biologia óssea local como se fossem uma raiz dental, estimulando a remodelação óssea de forma equilibrada.

1.2- Implantes dentários

Durante a evolução dos estudos sobre o processo de osseointegração vários materiais têm sido testados com o objetivo de aprimorar os resultados, sejam eles no que tangem a aceleração do processo de osseointegração, estabilidade óssea, gengival e estética.

De acordo com Huré et al.¹², os tipos básicos de materiais usados para implantes dentários são limitados. Três grupos têm sido descritos: o grupo dos metais e ligas metálicas, o grupo dos materiais cerâmicos, e o do carbono e polímeros sintéticos. Embora vários materiais sejam citados, comercialmente só dois tipos são disponibilizados para uso odontológico: as cerâmicas e o titânio. Durante as últimas décadas, implantes metálicos têm sido os mais freqüentemente utilizados, sendo que o titânio, em sua forma comercial pura, se tornou o material de escolha para a fabricação de implantes em cirurgia oral e craniofacial.

Steflik et al¹³ compararam implantes de titânio com implantes cerâmicos de alumina colocados em cães e testados sob carga mastigatória por um período de

seis meses. Os resultados obtidos não apresentavam diferença entre a quantidade e qualidade de tecido ósseo bem como da saúde do tecido conjuntivo e epitelial que estavam em contato com os dois diferentes tipos de materiais. Haubenreich et al.¹⁴ relataram que os implantes cerâmicos possuem algumas características mais estéticas quando comparados com o titânio, porém problemas como fratura do implante, microfissuras, dor e perda da osseointegração parecem ser mais freqüentes quando comparados com implantes de titânio.

O titânio se tornou o material mais utilizado em implantes intraósseos, segundo Hansson et al.¹⁵, pois esse metal possui características físicas e químicas excepcionais que permitem a sua instalação nos tecidos vivos sem que haja incompatibilidade entre eles. Propriedades físicas como seu coeficiente elástico, de deformação e sua resistência à tração são diferentes do tecido ósseo, porém não influenciam no sucesso deste tipo de tratamento. Sua grande resistência à fratura possibilita resistir aos esforços necessários para uma boa função mastigatória. Quimicamente o titânio é um metal muito estável, embora haja uma pequena formação de óxidos em sua superfície. Estes óxidos se formam durante o processo de corte, limpeza e esterilização do implante e ficam aderidos à superfície não sendo liberados para o meio. As propriedades supracitadas permitem a cicatrização e a manutenção da adesão das estruturas teciduais à superfície do titânio.

1.3- Zona de interface entre implante e tecidos receptores

Hansson et al.¹⁵ descreveram a zona de interface entre implante de titânio e osso. A composição média dos implantes de titânio é de 99,75% de titânio (Ti), 0,05% de ferro (Fe), 0,10% de oxigênio (O), 0,03% de nitrogênio (N), 0,05% de carbono (C) e 0,012% de hidrogênio (H). Decorrente do processo de fabricação e esterilização se forma na superfície do implante uma camada de óxidos na ordem de

50Å. Os óxidos que estão presentes na superfície do implante são o TiO_2 , TiO , Ti_2O_5 , sendo que, destes óxidos, o primeiro é citado pela autor como o mais comum. Os autores relatam que essa camada pode ser a responsável por prevenir o contato do metal puro com moléculas biológicas evitando reações indesejadas como uma fibrose e conseqüente encapsulamento do implante. No processo de adesão celular à superfície do implante, uma fina camada de proteoglicanas e glicosaminoglicanas se adere aos óxidos de titânio, seguida de fibras colágenas dispostas a uma distância aproximada de 200Å da superfície do implante. Os autores consideram as proteoglicanas como uma “cola” biológica, servindo de ancoragem primeiramente para as fibras colágenas que por sua vez servirão de arcabouço para a condução de células até a superfície de óxido de titânio podendo estas ser fibroblastos nas áreas em contato com os tecidos gengivais ou osteoblastos nas regiões intraósseas.

Hench¹⁶ descreve a influência das cargas elétricas na adesão de proteínas na superfície do titânio. A camada de óxidos de titânio formada na superfície do implante decorrente dos processos de fabricação, tem carga negativa (TiO_2). Por sua vez as estruturas protéicas que devem ser inicialmente adsorvidas na superfície do implante também são eletricamente negativas existindo, assim, uma incompatibilidade para a fixação destas ao titânio. O autor considera que o agente de ligação entre as estruturas protéicas e a superfície do implante, seriam íons bivalentes de cálcio (Ca^{2+}), que estariam disponíveis na região de instalação do implante.

1.4- Características histológicas e clínicas do sítio receptor

A cavidade bucal é revestida por uma mucosa composta por epitélio estratificado pavimentoso, paraqueratinizado, queratinizado ou não queratinizado e tecido conjuntivo adjacente. As partes da cavidade oral que são submetidas a

esforços mastigatórios como gengiva, dorso da língua e palato duro, são revestidos por uma mucosa mastigatória, que possui um epitélio estratificado pavimentoso paraqueratinizado ou totalmente queratinizado. As outras áreas da cavidade bucal são consideradas como sendo revestidas por mucosa de revestimento, composta por epitélio estratificado não queratinizado e tecido conjuntivo subjacente. Ainda pode se considerar as áreas que possuem estruturas gustativas como, dorso da língua e palato mole, como mucosa especializada. Analisando isoladamente as estruturas periodontais, que fazem a proteção e fixação do dente na sua loja óssea (alvéolo dental), temos na parte mais externa, em contato com a cavidade bucal, uma faixa de gengiva queratinizada composta pela gengiva marginal e gengiva inserida. Essa estrutura se continua junto ao dente dando origem ao sulco gengival com profundidade aproximada de 1 a 3mm ¹⁷ sendo revestido por um epitélio estratificado não queratinizado mais apical a essa região do sulco, se localiza o epitélio juncional que se prende as estruturas dentais por ligações desmossômicas. Desta forma o epitélio sulcular é próximo às estruturas dentárias, o epitélio juncional que é uma continuação do primeiro está no entanto justaposto aos componentes externos do dente (esmalte, e ou dentina e ou cemento). Mais profundamente ao epitélio juncional inexistente uma parede de epitélio e o tecido conjuntivo se relaciona diretamente com os constituintes do dente nesta região. O tecido conjuntivo é ricamente vascularizado e muito celular, sendo a última barreira de selamento entre o meio externo bucal e as estruturas de sustentação do dente. As estruturas de sustentação são constituídas por componente integrante da peça dental (cemento), pela camada superficial do osso onde está inserido o dente (parede do alvéolo) e um conjunto massivo de fibras colágenas que integra essas duas estruturas, o ligamento periodontal. Este é constituído de tecido conjuntivo denso não modelado, ricamente

vascularizado (plexo vascular do ligamento periodontal) e é localizado entre o cimento da raiz e o osso alveolar.

Estudos propõem que existe uma grande semelhança histológica e clínica entre o epitélio juncional, o epitélio sulcular, a gengiva inserida e o tecido conjuntivo que envolve o implante e as características dessas mesmas estruturas que envolvem os dentes naturais. Segundo Arvidson⁴; Buser et al.⁸; Hermann et al¹⁸, existe, porém, uma diferença importante que consiste no fato de que nos implantes dentários não existe ligamento periodontal, e isto traz como consequência uma diminuição na capacidade reacional local quando este tecido está sendo agredido por bactérias ou outro tipo de trauma, como por exemplo o trauma mecânico. Isto se deve à perda de estruturas vasculares importantes dessa região, que são removidas e/ou perdidas quando ocorre a remoção de uma peça dentária.

O tecido mole que se forma em torno do implante instalado em boca se chama gengiva periimplantar e apresenta características semelhantes aos tecidos periodontais. Porém há algumas particularidades que o deixam relativamente mais vulnerável e como consequência com uma maior probabilidade de existir problemas com seus tecidos de suporte em relação aos dentes naturais.

Os tecidos ósseo e conjuntivo do hospedeiro não reagem ao implante como a um corpo estranho por esse motivo os tecidos periimplantares estabelecem uma relação de contato íntimo com o titânio¹⁹. Nos implantes, como citado acima, não existe a presença de cimento e sendo essa estrutura ausente, as fibras colágenas da faixa de tecido conjuntivo adjacente ao epitélio juncional, que no dente estariam dirigidas perpendicularmente a sua superfície, no implante estão direcionadas paralelamente ao longo eixo do implante, ou então circundando esta estrutura, formando como se fosse um cinturão envolvendo a porção mais cervical do implante. Esta disposição de fibras encontra-se no tecido gengival circundante na

porção mais cervical do implante, gengiva periimplantar²⁰. Desta maneira a interação do tecido conjuntivo com a superfície de titânio fica prejudicada, pois não existe inserção de fibras no implante mas sim um contato direto de algumas estruturas celulares dos fibroblastos dessa região com a superfície do titânio. Como consequência deste fato, a interface implante/tecido conjuntivo torna-se mais frágil, não permitindo uma reação tecidual adequada quando ocorrer um acúmulo de patógenos responsáveis pelas doenças periimplantares.

Histologicamente, o tecido conjuntivo periimplantar é considerado mais fibroso, menos celular e com menor aporte vascular quando comparado com o do dente^{21,22}. A menor vascularização é decorrente do fato de que na região periimplantar não existe o plexo vascular originário do ligamento periodontal. O tecido do periimplante tem uma média de 1% a 3% de fibroblastos, enquanto os tecidos circundantes das estruturas dentais possuem uma média de 5% a 15% de fibroblastos nas regiões gengivais correspondentes. Comparando a quantidade de fibras colágenas, temos que no tecido periimplantar a proporção de colágeno chega a 85% e nos tecidos periodontais não ultrapassam 60%. Berglundh et al^{21,22} referem que a porção supra-alveolar da mucosa periimplantar na interface do tecido conjuntivo com o implante tem características de um tecido quelóide, rico em colágeno e pobre em células.

Segundo Berglundh et al²², a quantidade de fibroblastos é grande até a segunda semana de cicatrização, após a inserção do implante, diminuindo dramaticamente a partir da quarta semana de cicatrização. Abrahamsson et al.²³ sugerem que uma certa quantidade de tecido periimplantar é necessária para manter uma boa adesão à superfície do implante e uma capacidade reacional mais adequada. A ligação do tecido epitelial com a superfície do implante é estabelecida por hemidesmossomos, que estão presentes em menor quantidade na região

periimplantar do que na região periodonta²⁴. Os achados de Abrahamsson et al.²⁵ ratificam as descobertas de Gould et al.²⁴ sugerindo que tanto a adesão conjuntiva quanto epitelial são menos eficientes nos implantes quando comparadas com a encontrada nas estruturas dentais.

1.5- Superfície dos implantes

Diversos tratamentos de superfície têm sido executados visando melhorar a resposta biológica e promover um contato maior dos tecidos com superfície do implante.

Para diferenciar as superfícies dos implantes, segundo Sykaras et al.²⁶ deve ser considerado que, superfícies que tenham uma rugosidade menor que 1µm de aspereza superficial são classificados como implantes de superfície lisa, enquanto aqueles com rugosidade superior a 1µm são classificados como implantes de superfície áspera, rugosa, ou ainda de superfície tratada. Essas medidas são obtidas através da análise das superfícies do titânio por microscópio eletrônico de varredura tomando como referência o ponto mais alto de rugosidade (picos) e os pontos mais profundos (vales), medindo a distância média entre esse pontos se obtém o grau de rugosidade de uma superfície.

Muitas técnicas de tratamento de superfície são descritas na literatura. Entre as mais utilizadas estão: cobertura por “spray” de plasma de titânio ou hidroxiapatita, jateamento com partículas de óxido de alumínio, ataque com diferentes ácidos e eletrodeposição de óxidos.

Estudos como os de Cordioli et al.²⁷ revelam um maior potencial osteocondutor nos implantes que receberam algum tratamento de superfície quando comparados com os que foram somente maquinados, lisos. Estes autores demonstraram com testes de torque de remoção e histomorfometricamente, em

experimentos feitos em cães, que quando comparados os implantes tratados com “spray” de plasma de titânio com os maquinados lisos, os primeiros obtêm melhores respostas nos dois tipos de testes empregados. Adicionalmente a investigação de Cordioli et al.²⁷, outros trabalhos como os de Xiropaidis²⁸; Muller²⁹ 2006 e Goene³⁰ abrangendo genericamente a resposta óssea evidenciam uma melhor adesão de osteoblastos nos implantes de superfície tratada. Porém, quando são analisadas respostas de outras células, como por exemplo fibroblastos, em relação a diferentes tratamentos de superfície dos implantes, Eisenbarth et al.³¹ sugerem que, há uma diminuição do nível de adesão de fibroblastos quanto maior for a rugosidade superficial do titânio.

Poucos estudos relacionam a adesão de fibroblastos em superfícies de titânio. Trabalhos como o de Mustafa³² demonstram que a adesão dos fibroblastos é maior em superfícies de titânio liso. Superfícies rugosas parecem ter mais influência na adesão e proliferação de osteoblastos.

1.6- Relação da superfície do titânio com os tecidos moles

Os estudos em implantodontia têm se preocupado presentemente em descrever os benefícios dos implantes com as diferentes superfícies e sua relação com tecido ósseo. Em estudos iniciais de osseointegração, Thomas e Cook³³ compararam implantes com superfície tratada com os de superfície maquinada (lisa), colocados em ossos das patas de cães, e avaliaram tanto a relação destes implantes com o tecido ósseo, como a relação com os tecidos moles constituintes da pele onde foi feito o acesso cirúrgico. Os autores encontraram como resultado que, onde foram colocados implantes com superfície tratada o contato do implante com o tecido ósseo foi significativamente melhor do que as situações entre implantes lisos e osso. Por outro lado o inverso aconteceu em se tratando dos tecidos moles onde,

histologicamente foi encontrado que os implantes lisos se mostraram com a sua superfície coberta por tecido fibroso, o que não ocorreu da mesma forma com os de superfície texturizada. Steinemann et al.³⁴ obtiveram os mesmos resultados quando foram comparados implantes com superfície rugosa com os de superfície polida em experimentos com macacos, corroborando com a idéia de que implantes polidos obtêm um melhor relacionamento com os tecidos gengivais tanto no período cicatricial quanto após a cicatrização.

De forma complementar, o estudo de Brunette³⁵ (1992), demonstrou que se a superfície do implante for extremamente polida a adesão dos fibroblastos pode ficar comprometida, enquanto que pequenas rugosidades podem melhorar a adesão dessas células. Em um estudo de Eisenbarth et al³¹, os autores constataram que a adesão de fibroblastos em discos de titânio com rugosidade ou lisos aconteceu de forma diferente. Nos discos onde existem ranhuras na superfície a organização do citoesqueleto dos fibroblastos ocorre de maneira a acompanhar o formato e a orientação das estrias nos discos de titânio, proporcionando uma provável adesão melhor dos tecidos moles. No mesmo estudo em discos de titânio onde a superfície era polida, o citoesqueleto do fibroblasto parecia não estar orientado a seguir qualquer direção, as projeções citoplasmáticas não tinham direção específica e o pericário mostrava-se mais arredondado.

As adaptações dos implantes aos tecidos moles, que compõem o local de acesso cirúrgico, tanto em boca (mucosa bucal) quanto nos experimentos com animais (pele) tem sido objeto de vários estudos. Trabalhos clínicos apontam um aumento significativo no número de periimplantite, que segundo Pontoriero³⁶, é uma resposta inflamatória a uma invasão bacteriana inicialmente sobre os tecidos moles que traz tendo como consequência a perda de tecido de suporte, em pacientes que foram tratados com implantes com superfície rugosa como os demonstrados por

Lindhe et al.³⁷ e Quirynen³⁸. Neste trabalho a rugosidade da superfície do implante foi considerada como uma desvantagem por propiciar um meio onde as bactérias e os patógenos envolvidos, nas doenças periimplantares, podem se aderir mais facilmente com posterior dificuldade de descontaminação dos sítios infectados.

Segundo Drake et al.³⁹ os implantes com superfície rugosa oportunizam uma colonização maior por bactérias do que os de superfície lisa, sendo esse resultado da ordem de 1.14×10^6 CFU/mm² e 7.68×10^4 CFU/mm² respectivamente, o que poderia implicar em maior risco para a doença periimplantar e conseqüente insucesso do trabalho. Os estudos de Adell¹ e Lindquist⁴⁰, corroboram com essa idéia, pois relatam que há uma reação inflamatória periimplantar com subseqüente perda de osso marginal progressiva decorrente de um acúmulo de microorganismos patogênicos na superfície do implante tendo, nesse caso, um prognóstico negativo ao longo do tempo. A colonização bacteriana pode ser descrita como uma “corrida pelo espaço” entre as células do hospedeiro e as bactérias orais⁴¹. A maioria dos artigos revisados tem como resultado que a superfície lisa dos implantes, quando é considerado o contato com os tecidos moles, tem ainda uma resposta mais previsível e comprovada. Embora ainda não haja um consenso estabelecido de qual é a superfície ótima para a melhor e mais rápida adesão das células ao titânio, há à referência na maioria dos trabalhos como os de Ericsson⁴², Rühling⁴³, Groessner-Schreiber⁴⁴ e de Eisenbarth³¹ de que superfícies com rugosidade exagerada não obtêm resultados satisfatórios em relação à rapidez e qualidade de adesão dos fibroblastos.

1.7- Influência dos fatores de crescimento nos tecidos periimplantares

Os polipeptídios de fatores de crescimento representam um grupo biológico que tem um grande potencial para ser utilizado como estímulo quimiotático e

mitogênico assim como componentes da matriz extracelular e outros modificadores da resposta biológica celular que são potentes agentes para o auxílio da regeneração tecidual⁴⁵.

Levander (*apud* Solheim⁴⁶), determinou em 1938, que um extrato alcoólico de osso induzia a formação de cartilagem e de osso ectópico quando injetado, via intramuscular, em ratos, e concluiu que a regeneração óssea ocorreu, no local, como resultado da ativação de algumas substâncias formadoras de osso, a partir de células mesenquimais indiferenciadas.

Cada polipeptídeo de crescimento tem uma especificidade e uma eficácia farmacológica no mecanismo biológico, envolvendo interação receptor/ligante, vias de sinais de transdução e transcrição intracelular⁴⁷. Esses polipeptídeos em geral são sintetizados por um tecido específico, no qual, em baixas concentrações, atuam como reguladores locais da função celular. Os fatores de crescimento promovem as modificações na função celular ao se ligarem a receptores específicos na superfície da membrana da célula alvo. Esta ligação desencadeará, então, uma cascata de reações protagonizada por enzimas como proteínas quinases, que participam dos processos e sinalização celular.

Os fatores de crescimento mais citados na literatura e que são responsáveis pela cicatrização óssea e dos tecidos moles quando na colocação de implantes dentários seriam: proteína morfogenética óssea (BMP), fatores de crescimento semelhantes a insulina I e II (IGF-I e IGF-II), fator de crescimento e transformação β (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos ácido e básico (aFGF e bFGF), fator de crescimento endotelial (EGF), fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

No momento do ato cirúrgico de colocação de um implante dentário é produzida uma agressão ao osso e aos tecidos moles do local de acesso. No instante em que esses tecidos são lesados existe a liberação de fatores de crescimento que darão início a uma cascata de eventos como: diferenciação celular, quimiotaxia, recrutamento de células de defesa e inflamatórias e neovascularização, resultando em um processo de cicatrização óssea, e do tecido conjuntivo e epitelial que recobrem este osso. ¹¹

1.8- Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)

A família do fator de crescimento de fibroblasto (FGF) pertence a um grande grupo de fatores de crescimento, constituída por mais de 30 membros nos humanos, tendo este diversas funções biológicas importantes e influenciando em vários processos celulares como: estímulo da síntese de DNA, proliferação celular, diferenciação e migração, efeitos quimiotáticos, interação célula/célula. *In vivo* os FGFs têm sido implicados no desenvolvimento embrionário, sobrevivência neural, reparo de danos teciduais e angiogênese, e também são encontrados na neovasclogênese de tumores⁴⁸.

Os fatores de crescimento de fibroblastos ácido e básico (aFGF e bFGF), são considerados potentes quimiotáticos e mitogênicos para células endoteliais e a maioria das células de origem mesenquimal⁴⁹.

O estudo de Takehara⁴⁷ comparou a eficiência de vários fatores de crescimento (PDGF, EGF, bFGF, aFGF, TGF- α , TGF- β) sendo eles utilizado-os em associação ou isolados, em cultura de fibroblastos de pele. Neste estudo os grupos tratados com uma associação de dois fatores de crescimento obtiveram boas respostas celulares, enquanto a utilização isolada de um fator de crescimento não obteve resultados significativos com a exceção do bFGF que obteve uma diferença

significativa quando utilizado isoladamente. Neste mesmo trabalho o autor relata que bFGF estimula a divisão e migração de fibroblastos e células epiteliais, promovendo formação de novos capilares e tecido de granulação.

O bFGF também afeta o comportamento de fibroblastos *in vitro*, estimulando o aumento da proliferação celular e a síntese de matriz⁵⁰. Fibroblastos provenientes de tecidos distintos reagem diferentemente aos fatores de crescimento⁵¹.

1.9-Hipótese

O selamento promovido pelo tecido conjuntivo em um implante dentário é de extrema importância para o sucesso do tratamento a longo prazo. Essa ligação do implante com o tecido é dependente da função dos fibroblastos, tanto na formação inicial quanto no reparo desta, se necessário.

A proposição hipotética é a de que aumentando a concentração de bFGF no meio haja uma resposta mais favorável dos fibroblastos, ocorrendo uma maior diferenciação e por conseguinte uma mais rápida e efetiva adesão de células na superfície do titânio.

A adição do fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), produz um melhor recobrimento da superfície do titânio por fibroblastos?

1.10- Justificativa

Atualmente a colocação de implante em locais de ausência dentária é a primeira escolha de tratamento. Esses procedimentos vêm sendo utilizados por mais de 30 anos com um sucesso que ultrapassa 95%, podendo ser considerado um tratamento de rotina em algumas clínicas odontológicas. Depois de estabelecida a osseointegração, alguns fatores podem causar a falha desses implantes como, por exemplo, uma carga oclusal deletéria ou um processo de infecção causado por

contaminação da superfície dos implantes por bactérias específicas causadoras de periimplantite. O risco dessa invasão bacteriana pode ser reduzido quanto maior for a adesão do tecido conjuntivo ao implante, ou quanto mais rápido ela se reconstituir após uma agressão que rompa essa relação. Por isso, torna-se necessário a investigação de recursos que tornem a união implante e tecido conjuntivo mais efetiva ou em se rompida, que tenha condições de recuperar essa adesão o mais rápido possível.

1.11- Objetivos

1.11.1- Geral

O objetivo desse estudo é avaliar a adesão de fibroblastos NIH3T3 na superfície de discos de titânio com e sem a adição de fator de crescimento bFGF .

1.11.2- Específicos

- Avaliar comparativamente a morfologia dos fibroblastos do grupo teste, com adição de bFGF, e grupo controle, sem adição desse fator de crescimento;
- Avaliar a presença de fibroblastos aderidos na superfície de discos de titânio.
- Avaliar a distribuição das células nos discos de titânio;

2. Artigo Científico

Este artigo científico compila os principais resultados do nosso trabalho e será submetido à revista Clinical Oral Implants Research.

3. Considerações finais

O sucesso dos implantes dentários é fortemente dependente de uma firme e longa adesão dos tecidos que rodeiam o implante. As estruturas periimplantares são necessárias para proteger o implante da invasão bacteriana e subsequente infecção. A reação celular desses tecidos é influenciada pelas propriedades bioquímicas do material (titânio) como também as propriedades de sua superfície, topografia e a composição química tanto do implante quanto do local de instalação do mesmo⁴⁵.

Neste estudo foram avaliadas comparativamente a presença ou ausência de células de fibroblastos NIH3T3 em discos de titânio com e sem a adição do fator de crescimento bFGF. Os resultados obtidos demonstraram uma diferença significativa na quantidade de superfície recoberta por células no grupo teste (com adição de bFGF) em relação ao grupo controle (sem adição de bFGF). As amostras foram avaliadas com três, vinte e quatro e quarenta e oito horas. Em todos os intervalos avaliados os resultados do grupo teste superaram o controle em mais de 50%, obtendo uma diferença significativa em todos os grupos. A diferença entre os grupos foi acentuada com o maior tempo de incubação das amostras, sendo de 52,4% em três horas, passando para 55,8% em vinte e quatro horas e chegando a 114% com quarenta e oito horas de incubação. Esses resultados demonstraram que o potencial de estimulação do bFGF em fibroblastos NIH3T3 influenciou a amostra por pelo menos quarenta e oito horas após a sua administração.

Diversos estudos e técnicas foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar a adesão e a proliferação de fibroblastos em superfícies de titânio⁵³. Foi utilizado dióxido de titânio (TiO₂) para avaliar a adesão de fibroblastos, após testar em cinco grupos (1 hora, 3 horas, 24 horas, 3 dias e 7 dias) e concluíram que houve uma diminuição na adaptação inicial das células na superfície de titânio. Khadra et al.⁵⁴ testou “terapia a laser” com relação ao crescimento gengival de fibroblastos

humanos e encontraram resultados favoráveis apenas nos primeiros momentos de estabelecimento tecidual. Os resultados destes testes demonstram uma melhora inicial no potencial de adesão de fibroblastos, porém ao longo do tempo esse potencial se estabiliza não havendo ganhos significativos quando comparados com o grupo controle. Os resultados do presente estudo demonstraram o potencial do bFGF de manter e aumentar o recobrimento celular quanto maior o tempo de incubação, considerando como referência a tempo máximo de 48 horas.

Os estudo de Arvidson⁴; Buser et al.⁸; Hermann et al.¹⁸ sugerem que os tecidos moles que circundam o implante não possuem características ideais para uma boa reação de defesa, contra invasão bacteriana, e regeneração, pois segundo os autores esses tecidos possuem características de tecidos cicatriciais, com maior número de fibras e menor número de células viáveis disponíveis. Para Arvidson et al.^{4,5}; Listgarten et al.^{6,7}; Buser et al.⁸ e Berglundh⁹ depois de estabelecida a osseointegração o maior desafio é a manutenção do selamento feito pelos tecidos periimplantares que é diretamente dependente das características funcionais e reacionais dos tecidos dessa região. Essas observações justificam a presente investigação. O aumento da quantidade de fibroblastos devido à adição de bFGF ao meio possibilitou um maior número de células depositadas à superfície dos discos de titânio. Esse maior número de células viáveis no meio poderia, *in vivo*, modificar algumas características citadas anteriormente e tornar as características da gengiva periimplantar mais próximas à gengiva periodontal. A viabilidade de fibroblastos na intimidade dos tecidos da gengiva periimplantar pode diminuir a aparência de tecido cicatricial (quelóide) pois a proporção célula/fibras seria alterada, isto é, a capacidade de resposta e de cicatrização também poderia ser modificada. Como não é viável aumentar a vascularização local, o aumento do número de células poderia acelerar os processos de reparo pois, quando lesado o tecido periimplantar,

as células presentes em grande número na intimidade do tecido proporcionariam uma reação mais rápida, e conseqüentemente uma nova adesão à superfície do implante e a interrupção de um processo que poderia levar a perda de níveis ósseos, tornando o dano clínico e morfológico biologicamente irreparável.

A utilização de FGF em estudos voltados para o reparo de defeitos no tecido ósseo *in vivo*^{55,56}, e na melhora do processo de osseointegração⁵⁷ reforçam a possibilidade da utilização desse fator de crescimento para melhorar as características teciduais tanto ósseas quanto da gengiva periimplantar, isto é, se na utilização de bFGF para crescer qualidade nos tecidos moles em torno do implante não haveria comprometimento do processo de osseointegração, mas sim, uma provável melhora.

As evidências descritas neste trabalho indicam grandes possibilidades da utilização do fator de crescimento de fibroblastos básico para melhorar as características dos tecidos que circundam os implante de titânio. Porém mais estudos devem ser realizados para um melhor entendimento dos benefícios que esse fator de crescimento pode acrescentar ao tratamento com implantes de titânio.

4. Referências bibliográficas

- 1** Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15- years study of osseointegrated implants in treatment of the edentulous jaws. *Int J Oral Surg.* 1981 Dec;10(6):387-416.
- 2** Locker D. Patient-based assessment of the outcomes of implant therapy: a review of the literature. *Int J Prosthodont.* 1998 Sep-Oct;11(5):453-61.
- 3** Albrektsson T, Sennerby L. Direct bone anchorage of dental implants.; *J Prosthet Dent.* 1990 Nov;1(4):307-20.
- 4** Arvidson K., Bystedt, H., Ericsson, I. Histometric and ultrastructural studies of tissue surrounding Astra dental implants in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants,* 1990 Summer;5(2):127-34.
- 5** Arvidson K, Fartash B, Hilliges M, Köndell PA. Histological characteristics of peri-implant mucosa around Branemark and single-crystal sapphire implants. *Clin Oral Implants Res.* 1996 Mar;7(1):1-10.
- 6** Listgarten MA, Lang NP, Schroeder HE, Schroeder A. Periodontal tissues and their counterparts around endosseous implants. *Clin Oral Implants Res.* 1991 Jul-Sep;2(3):1-19.
- 7** Listgarten MA. Soft and hard tissue response to endosseous dental implants. *Anat Rec.* 1996 Jun;245(2):410-25.
- 8** Buser D, Weber HP, Donath K, Fiorellini JP, Paquette DW, Williams RC.. Soft tissue reactions to non-submerged unloaded titanium implants in beagle dogs. *J Periodontol.* 1992 Mar;63(3):225-35.
- 9** Berglundh T. Studies on gingiva and periimplant mucosa in dog. Tese de PhD, Dpartment of Periodontology, Faculty of Odontology, University of Gotebörg, Sweden. 1993.

- 10** Klinge B, Meyle J; On behalf of Working Group 2. Soft-tissue integration of implants. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Oct;17 Suppl 2:93-6.
- 11** Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of Dental Education.* 2003 Aug;67(8):932-49.
- 12** Huré G, Donath K, Lesourd M, Chappard D, Baslé MF. Does titanium surfaces treatment influence the bone-implant interface? SEM and histomorfometry in 6-month sheep study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996 Jul-Aug;11(4):506-11.
- 13** Steflik DE, McKinney RV Jr, Koth DL. Ultrastructural comparisons of ceramic and titanium dental implants in vivo: a scanning electron microscopic study. *J Biomed Mater Res.*; 1989 Aug;23(8):895-909.
- 14** Haubenreich JE, Robinson FG, West KP, Frazer RQ. Did we push dental ceramics too far? A brief history of ceramic dental implants. *J Long Term Eff Med Implants.* 2005;15(6):617-28.
- 15** Hansson HA, Albrektsson T, Branemark PI. Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants. *J Prosthet Dent.* 1983 Jul;50(1):108-13.
- 16** Hench LL. Special report: the interfacial behavior of biomaterials, 1979. *J Biomed Mater Res.* 1980 Nov;14(6):803-11.
- 17** Lindhe J, Berglundh T.. The interface between the mucosa and the implant. *Periodontol 2000.* 1998 Jun;17:47-54.
- 18** Hermann JS, Buser D, Schenk RK, Schoolfield JD, Cochran DL. Biologic Width around one and two-piece titanium implants. *Clin Oral Implants Res.* 2001 Dec;12(6):559-71.
- 19** Zitzmann NU, Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J. Soft tissue reactions to plaque formation at abutments with different surface topography. *J Clinical Periodontol.* 2002 May;29(5):456-61.

- 20** Schierano G, Ramieri G, Cortese M, Aimetti M, Preti G. Organization of the connective tissue barrier around long-term loaded implant abutments in man. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Oct;13(5):460-4.
- 21** Berglundh T, Lindhe J. Dimension of the periimplant mucosa. Biological width revisited. *J Clin Periodontol.* 1996 Oct;23(10):971-3.
- 22** Berglundh T, Abrahamsson I, Welander M, Lang NP, Lindhe J. Morphogenesis of the peri-implant mucosa: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Feb;18(1):1-8.
- 23** Abrahamsson I, Berglundh T, Wennström J, Lindhe J. The peri-implant hard and soft tissues at different implant systems. A comparative study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 1996 Sep;7(3):212-9.
- 24** Gould TR, Westbury L, Brunette DM. Ultrastructural study of the attachment of human gingiva to titanium in vivo. *J Prosthet Dent.* 1984 Sep;52(3):418-20.
- 25** Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Linder E, Wennerberg A, Lindhe J. The mucosal attachment to titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2002 May;29(5):448-55.
- 26** Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000 Sep-Oct;15(5):675-90.
- 27** Cordioli G, Majzoub Z, Piattelli A, Scarano A. Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: an experimental study in the rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000 Sep-Oct;15(5):668-74.
- 28** Xiropaidis AV, Qahash M, Lim WH, Shanaman RH, Rohrer MD, Wikesjö UM, Hall J. Bone-implant contact at calcium phosphate-coated and porous titanium oxide (TiUnite)- modified oral implants. *Clin Oral Implants Res.* 2005 Oct;16(5):532-9.

- 29** Müller R, Abke J, Schnell E, Scharnweber D, Kujat R, Englert C, Taheri D, Nerlich M, Angele P. Influence of surface pretreatment of titanium- and cobalt-based biomaterials on covalent immobilization of fibrillar collagen. *Biomaterials*. 2006 Aug;27(22):4059-68. Epub 2006 Mar 31.
- 30** Goené RJ, Testori T, Trisi P.. Influence of a nanometer-scale surface enhancement on de novo bone formation on titanium implants: a histomorphometric study in human maxillae. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2007 Jun;27(3):211-9.
- 31** Eisenbarth E, Velten D, Schenk-Meuser K, Linez P, Biehl V, Duschner H. et al. Interactions between cells and titanium surfaces. *Biomol Eng*, 2002 Aug;19(2-6):243-
- 32** Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez BS, 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. *Clin Oral Implants Res*. 2001 Oct;12(5):515-25.
- 33** Thomas KA, Cook SD. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J Biomed Mater Res*. 1985 Oct;19(8):875-901.
- 34** Steinemann SG. Metal implants and surface reactions. *Injury*. 1996;27 Suppl 3:SC16-22.
- 35** Brunette DM. In vitro models of biological responses to implants. *Adv Dent Res*. 1999 Jun;13:35-7.
- 36** Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelli A, Nyman SR, Lang NP. Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res*. 1994 Dec;5(4):254-9.
- 37** Lindhe J, Berglundh T, Ericsson I, Liljenberg B, Marinello C. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res*. 1992 Mar;3(1):9-16.

- 38** Quirynen M, Bollen CM, Papaioannou W, Van Eldere J, van Steenberghe D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996 Mar-Apr;11(2):169-78.
- 39** Drake DR, Paul J, Keller JC. Primary bacterial colonization of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999 Mar-Apr;14(2):226-32.
- 40** Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clin Oral Implants Res*. 1996 Dec;7(4):329-36. Erratum in: *Clin Oral Implants Res*. 1997 Aug;8(4):342.
- 41** Gritina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*. 1987 Sep 25;237(4822):1588-95.
- 42** Ericsson I, Lekholm U, Sennerby L, Holmén A. Soft tissue response to clinically contaminated and thereafter cleaned titanium surfaces. An experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res*. 2000 Aug;11(4):370-3.
- 43** Rühling A, Hellweg A, Kocher T, Plagmann HC. Removal of HA and TPS implant coatings and fibroblast attachment on exposed surfaces. *Clin Oral Implant Res*, 2001 Aug;12(4):301-8.
- 44** Groessner-Schreiber B, Neubert A, Müller WD, Hopp M, Griepentrog M, Lange KP. Fibroblast growth on surface-modified dental implants: An *in vitro* study, *J Biomed Mater Res*. 2003 Mar 15;64(4):591-9.
- 45** Köhl R, Antoine M, Reimers K, Kiefer P. FGF3 attached to a phospholipids membrane anchor gains a high transforming capacity. *J Biological Chem*. 2002 Sep 6;277(36):32760-7. Epub 2002 Jun 25.
- 46** Solheim E. Growth factors in bone. *International Orthopaedics*, 1998 feb;22(6):410-416.

- 47** Takehara K. Growth regulation of skin fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2000 Dec;24 Suppl 1:S70-7.
- 48** Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* v. 15, n. 409(6822), p.860-921, Feb 2001. Erratum in: *Nature*, 2001 Feb 15;409(6822):860-921.
- 49** Sporn MB, Roberts AB. Peptide growth factors and inflammation, tissue repair, and cancer. *J Clin Invest.* 1986 Aug;78(2):329-32.
- Steinemann SG. Metal implants and surface reactions. *Injury.* 1996;27 Suppl 3:SC16-22.
- 50** Chan BP, Chan KM, Maffulli N, Webb S, Lee KK. Effect of basic fibroblast growth factor. An in vitro study of tendon healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1997 Sep;(342):239-47.
- 51** Scherping SC Jr, Schmidt CC, Georgescu HI, Kwoh CK, Evans CH, Woo SL. Effect of growth factors on the proliferation of ligament fibroblasts from skeletally mature rabbits. *Connect Tissue Res.* 1997;36(1):1-8.
- 52** Mustafa K, Silva Lopez B, Hultenby K, Wennerberg A, Arvidson K. Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surfaces blasted with TiO₂ particles. A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res.* 1998 Jun;9(3):195-207.
- 53** Khadra M, Kasem N, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Laser therapy accelerates initial attachment and subsequent behaviour of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. A scanning electron microscope and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2005 Apr;16(2):168-75.
- 54** Tabata Y, Yamada K, Miyamoto S, Nagata I, Kikuchi H, Aoyama I, Tamura M, Ikada Y. Bone regeneration by basic fibroblast growth factor complexed with biodegradable hydrogels. *Biomaterials.* 1998 Apr-May;19(7-9):807-15.

55 Franke Stenport V, Johansson CB, Sawase T, Yamasaki Y, Oida S. FGF-4 and titanium implants: a pilot study in rabbit bone. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Jun;14(3):363-8.

56 McCracken M, Lemons JE, Zinn K. Analysis of Ti-6Al-4V implants placed with fibroblast growth factor 1 in rat tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001 Jul-Aug;16(4):495-502.