

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Concentração Implantodontia

**ANÁLISE DOS EFEITOS TÓXICOS DOS TRATAMENTOS DE
PERIIMPLANTITE NOS OSTEOLASTOS CULTIVADOS SOBRE
DIFERENTES TIPOS DE SUPERFÍCIES DE IMPLANTES**

Dissertação de Mestrado

Cesar Augusto Magalhães Benfatti

Florianópolis - 2006

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito dos tratamentos químicos de periimplantite nos osteoblastos cultivados sobre implantes com diferentes superfícies. Osteoblastos provenientes de uma cultura primária de ratos foram cultivados por 48 e 72 horas sobre implantes com superfície usinada (grupo 1), texturizada por ataque ácido (grupo 2) e por jateamento de partículas de óxido de alumínio mais ataque ácido (grupo 3), tratadas ou não com EDTA e ácido cítrico suplementado com tetraciclina. A toxicidade dos tratamentos de periimplantite foi determinada pela contagem do número de osteoblastos presentes na superfície dos implantes durante os dois períodos analisados. No período inicial os implantes submetidos aos tratamentos de descontaminação obtiveram um número de células significativamente menor do que os grupos controles, já com 72 horas houve uma tendência de igualar o número de células dos grupos experimentais quando comparados com os grupos controles. Os resultados mostram uma diminuição da toxicidade dos produtos testados com o passar do tempo e que após 48 horas essa toxicidade não é prejudicial à proliferação celular, sugerindo a viabilidade clínica da utilização desses produtos com o objetivo de tornar as superfícies implantares mais favoráveis aos tecidos. Contudo ainda serão necessários estudos adicionais para afirmar com segurança qual dos tratamentos é biologicamente melhor para cada tipo de superfície de implante e seus efeitos sobre a reparação tecidual *in vivo*.

Palavras chave: implante, periimplantite, tratamento químico e osteoblastos.

INTRODUÇÃO

Os implantes são atualmente o melhor e mais bem sucedido tratamento para a reposição de elementos dentários perdidos, contudo é comum se verificar a presença de inflamações ao redor destes. A presença de inflamação, mais a perda óssea ao redor dos implantes são sinais de que um quadro de doença periimplantar está instalado. Essa doença é responsável por gerar a perda da osseointegração, e por conseqüência inviabilizar a manutenção em boca de um grande número de implantes. Estudos mostraram que 10% dos implantes em fase de manutenção são acometidos por esse tipo de doença ¹². Um dos fatores responsáveis por isso é a presença de bactérias patogênicas, que assim como é verificado sobre a superfície dentária, se aderem aos implantes e promovem a migração para apical dos tecidos que os margeiam, promovendo a perda da osseointegração nas áreas acometidas pela doença ⁴.

A eliminação das bactérias patogênicas que colonizam a superfície implantar é fator primordial para o controle das doenças que os acometem, e por conseqüência o restabelecimento da saúde dos tecidos periimplantares. Com o objetivo de se conseguir uma desinfecção das superfícies dos implantes, e com isso possibilitar que o osso e o implante se reintegrem, vários tratamentos foram propostos, dentre eles é possível citar a descontaminação por meio da aplicação tópica de ácido cítrico, ácido cítrico suplementado com tetraciclina e EDTA em gel ²¹.

Existe um paradoxo na literatura quanto à possibilidade de reosseointegração, as técnicas reconstrutivas nos casos em que houve uma perda óssea e uma colonização da superfície implantar por bactérias. Clínica e radiograficamente é possível se averiguar a

formação de nova estrutura óssea, porém as pesquisas mostram que histologicamente não há um contato direto do osso com a superfície do implante que teria sido colonizada por bactérias, verificando a presença de um tecido fibroso entre o osso e essa superfície ^{9,13,16}. Um dos supostos fatores que interfeririam nessa reosseointegração osso e implante seria a dificuldade de descontaminação e a toxicidade dos tratamentos de limpeza das mesmas realizadas, que inibiriam a recolonização dessas áreas por células ósseas ¹⁰.

Essa preocupação aumentou ainda mais quando na década de noventa começaram a surgir no mercado implantes com superfícies texturizadas. Essa alteração na rugosidade superficial tem por objetivo aumentar o contato osso implante, principalmente em áreas de baixa densidade óssea e de enxertos ósseos, além de promover uma osseointegração mais rápida, elevando a previsibilidade nos casos de implantes imediatos com ou sem a colocação dos mesmos em função também imediatamente ^{14,15}. A texturização se dá por meio de tratamentos químicos e/ou físicos. Essas superfícies possuem uma topografia mais rugosa do que as que eram verificadas nos implantes submetidos somente ao processo de usinagem. As características topográficas dessas novas superfícies levaram os pesquisadores a sugerir que seria, devido ao aumento rugosidade e energia de superfície, maior a adesão bacteriana sobre as mesmas, contudo seria mais dificultosa sua descontaminação ^{19, 20}.

Recentes trabalhos têm demonstrado que a presença de bactérias patogênicas nas superfícies submetidas a texturização é similar a encontrada na usinada somente ¹⁵. E que os métodos de tratamento anti-infectivo dos diferentes tipos de superfícies não são estatisticamente significantes quando comparados entre si, entre os tipos de superfícies e de descontaminantes ⁶.

Um fator pouco discutido e foco de escassos estudos são as respostas celulares e teciduais que os tratamentos de periimplantites geram no osso, principalmente nas células osteoprogenitoras. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito dos tratamentos de periimplantite nas células ósseas cultivadas sobre implantes de titânio com diferentes tipos de superfícies.

MATERIAL E MÉTODOS

CULTIVO CELULAR

LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTURA:

Foi utilizada uma linhagem celular primária de osteoblastos oriunda de calvária de rato (*rattus norvegicus*), OSTEO II, que se encontrava na terceira passagem celular, estocada em nitrogênio líquido e protegida por dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma Chemical, C.O., St. Louis, MO, USA).

As células foram descongeladas em banho Maria a 37°C por 60 segundos, transferidas para placas de Petri de 75 cm², com 15 ml de meio de cultivo fresco e mantidas em estufa a uma temperatura de 37°C, em atmosfera úmida, contendo ar saturado em 5% de CO₂. Após as células aderirem, o meio foi trocado, isso ocorreu dentro de um período máximo de 24 horas para que os efeitos do DMSO não produzissem quaisquer alterações celulares. O crescimento dessas foi monitorado diariamente em microscópio de fase invertida e o meio de cultura trocado a cada dois ou três dias, sempre de acordo com o

metabolismo celular. A necessidade de troca do meio de cultura foi feita pelo método visual, com observação da vitalidade celular, coloração e aspecto do meio.

Na subconfluência, as células foram subcultivadas de acordo com a necessidade de novas placas. O meio de cultura foi removido, os implantes lavados duas vezes com PBS, sem cálcio e magnésio, pH 7,2 e então separadas com um ml de solução de tripsina (Sigma) a 0,25% com EDTA um mM (Sigma) durante aproximadamente cinco minutos. A tripsina foi inativada com meio de cultura fresco, quatro ml de Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), contendo ampicilina (0,025 g/L), estreptomicina (0,1 g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino. Então as células em suspensão foram contadas na câmara de Neubauer (hemocitômetro), para determinar a concentração de células por microlitro. Todos os procedimentos experimentais foram realizados sob capela de fluxo laminar.

DIVISÃO DOS GRUPOS

As amostras foram divididas em três grupos, cada grupo foi composto por três subgrupos com três implantes:

- Grupo I: implantes usinados (U)
 - o sem tratamento de periimplantite (controle)
 - o tratados com EDTA trissódico 24% em gel (três minutos)
 - o tratados com ácido cítrico pH 1, 50%, mais tetraciclina 5% em gel (três minutos)
- Grupo II: implantes com superfície texturizada por meio de ataque ácido (Ac)
 - o sem tratamento de periimplantite (controle)
 - o tratados com EDTA trissódico 24% em gel (três minutos)

- tratados com ácido cítrico pH 1, 50%, mais tetraciclina 5% em gel (três minutos)
- Grupo III: implantes com superfície texturizada por meio de jateamento de partículas de óxido de alumínio mais ataque ácido (J+Ac)
 - sem tratamento de periimplantite (controle)
 - tratados com EDTA trissódico 24% em gel (três minutos)
 - tratados com ácido cítrico pH 1, 50%, mais tetraciclina 5% em gel (três minutos)

PREPARO DAS AMOSTRAS

Semearam-se, em média, 1×10^4 osteoblastos por implante. Os implantes foram imobilizados por meio de grampos de aço presos no nível da primeira rosca, impedindo assim que os mesmos pudessem rolar ou se movimentar dentro dos poços dificultando a adesão e proliferação celular (figura 01). Após o assentamento dessas células (cinco minutos), os mesmos foram mantidos imersos em DMEM, contendo ampicilina (0,025 g/L), estreptomicina (0,1 g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino, em uma temperatura de 37°C e pressão atmosférica de 5% CO₂ com 95% ar, em placas de 6 poços (figuras 02 e 03).

As amostras foram submetidas á análise de proliferação celular após os períodos de 48 e 72 horas (n = 54).



Figura 1: Implante imobilizado por meio de grampo metálico estéril

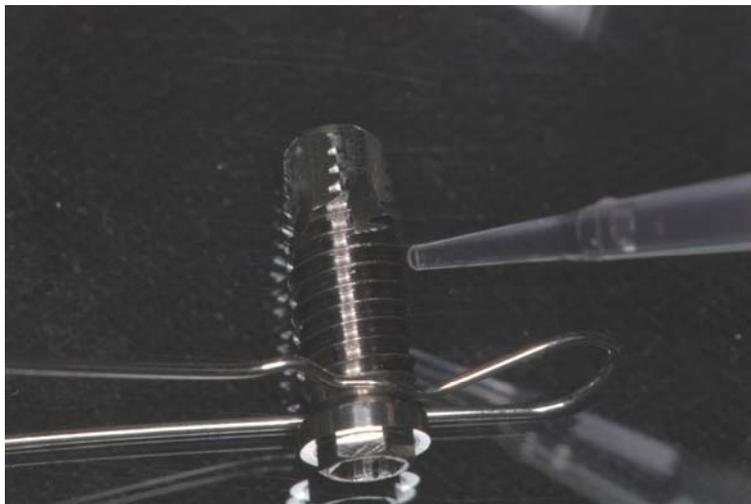


Figura 2: Células sendo semeadas sobre a superfície do implante, 1×10^4 células

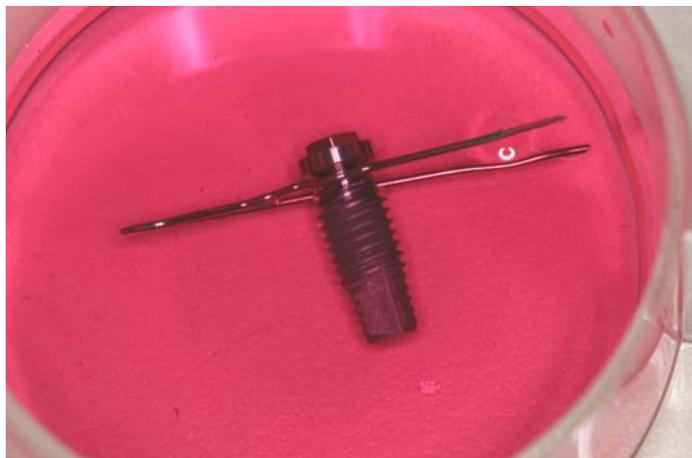


Figura 3: Implante totalmente submerso em meio de cultura, após cinco minutos das células semeadas.

CONTAGEM CELULAR

Realizou-se a semeadura das células sobre os implantes e aguardou-se o período experimental, separaram-se as células por meio da imersão desses dentro de um tubo de ensaio contendo um ml de tripsina, durante cinco minutos. Colocou-se então mais um ml de meio fresco e a suspensão de células foi centrifugada durante cinco minutos com uma velocidade de 300g. O precipitado foi ressuspensão em um ml de meio de cultura DMEM. Os dois lados da câmara de Neubauer receberam a suspensão e realizou-se a contagem celular com microscopia de luz (100x). Os números de células vivas foram contadas considerando o formato e a textura celular. A leitura de cada material foi realizada em duplicata e para efeito de análise dos resultados foi tirada a média dos dois valores (figuras 04 e 05).

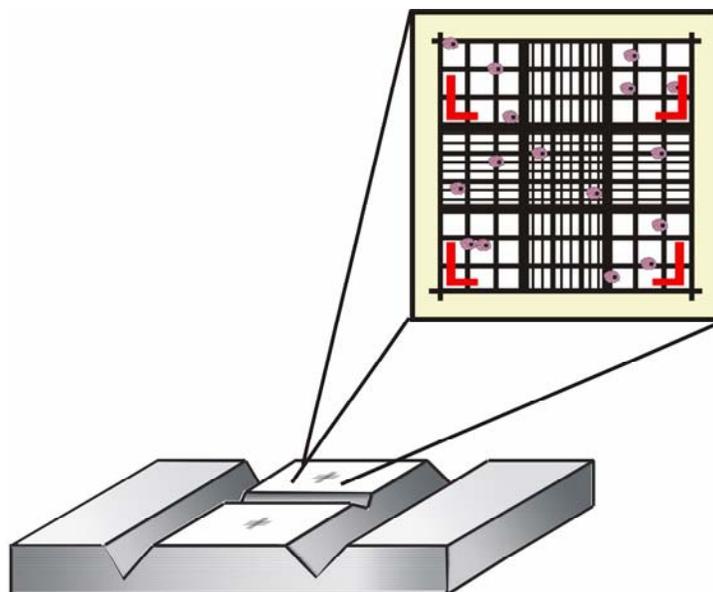


Figura 4: Desenho esquemático de um hemocitômetro; em maior aumento uma simulação da imagem visualizada no microscópio óptico, foram contadas somente as células presentes dentro dos quadrantes indicados (L)

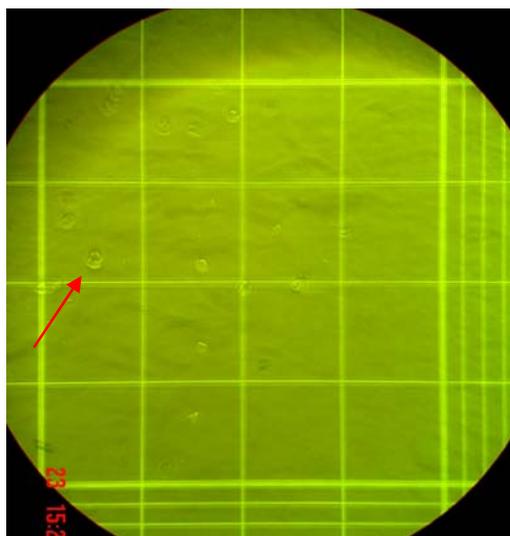


Figura 5: Imagem do hemocitômetro durante a contagem de osteoblastos, exemplificado pela seta (↑), (100x)

Para este artigo foi levado em consideração somente o número de células viáveis. O número de viabilidade celular é dado pelo total de células vivas contadas multiplicadas pela diluição realizada e por 10^4 , dividido pelo número de quadrantes contados (quadro 01).

$$\begin{array}{l} \text{Número total} \\ \text{de} \\ \text{Células viáveis} \end{array} = \frac{\text{Número total de células vivas x diluição x } 10^4}{\text{Número de quadrantes contados}}$$

Quadro 01: Número da viabilidade celular

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados através do teste ANOVA. Para os casos onde foram detectadas diferenças após esse teste, foi verificada a homogeneidade das variâncias segundo Bartlett e aplicado um teste de comparação entre médias segundo Tukey, o programa utilizado foi o Estatística 6.0.

RESULTADOS

Verificou-se que no período inicial, 48 horas, em todos os grupos, os controles apresentaram maior número de células (Figura 6 e 7). Exceto no grupo 3, no qual, incluindo o controle, se obteve um crescimento celular baixo e com ausência de significância estatística entre os grupos.

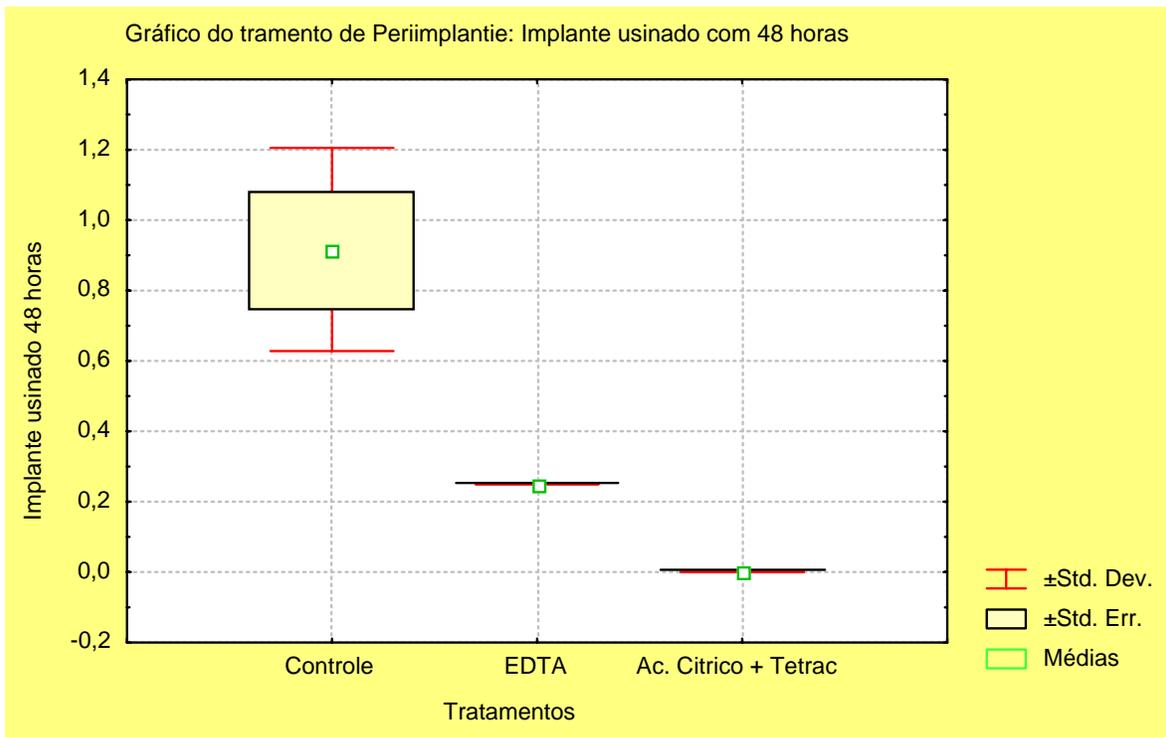


Figura 6: Gráfico mostrando a diferença estatística entre os grupos nos implantes usinados ($p < 0,01$)

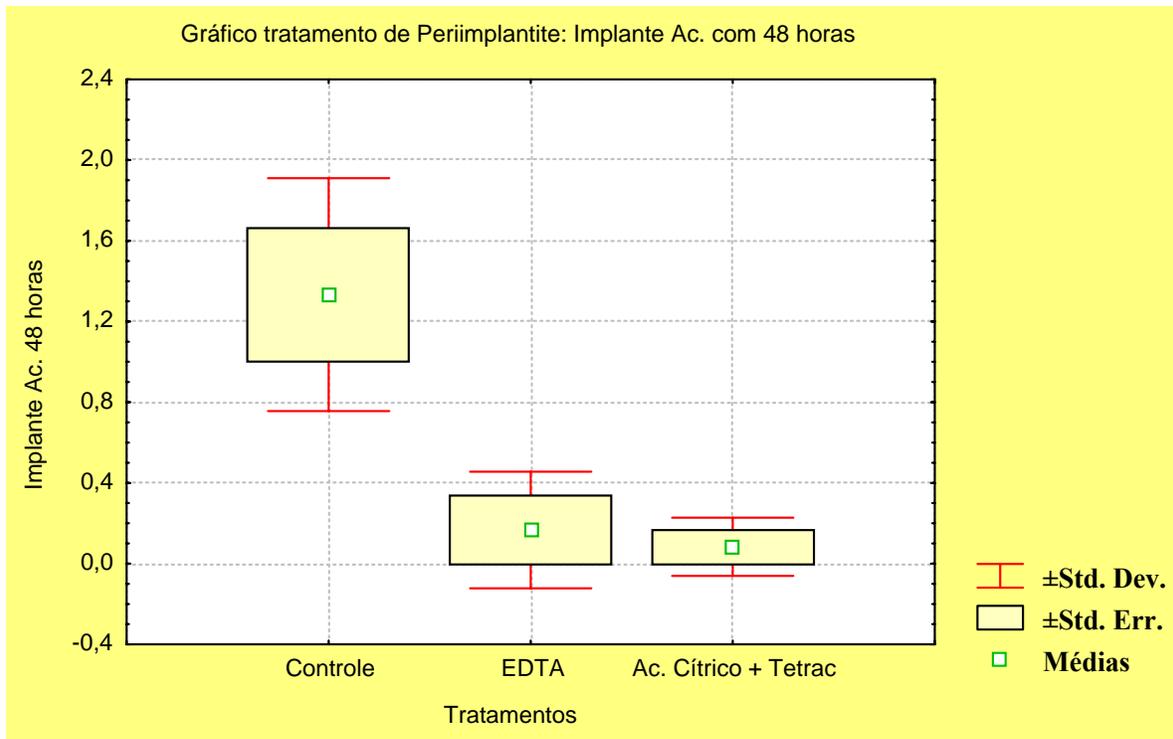


Figura 7: Gráfico mostrando a diferença estatística entre os grupos nos implantes Ac ($p < 0,05$)

Com 72 horas as diferenças no crescimento celular entre o controle e os subgrupos experimentais no grupo 1 se mantiveram significantes, enquanto que no grupo 2 a taxa de crescimento celular dos grupos experimentais foi elevada, a ponto de o número de células viáveis se tornarem estatisticamente semelhantes á do grupo controle. No caso do grupo 3 o subgrupo tratado com ácido cítrico mais tetraciclina manteve a diferença no número de células em relação ao controle, entretanto os implantes tratados com EDTA terminaram por igualar este número quando comparado com o mesmo (figura 08).

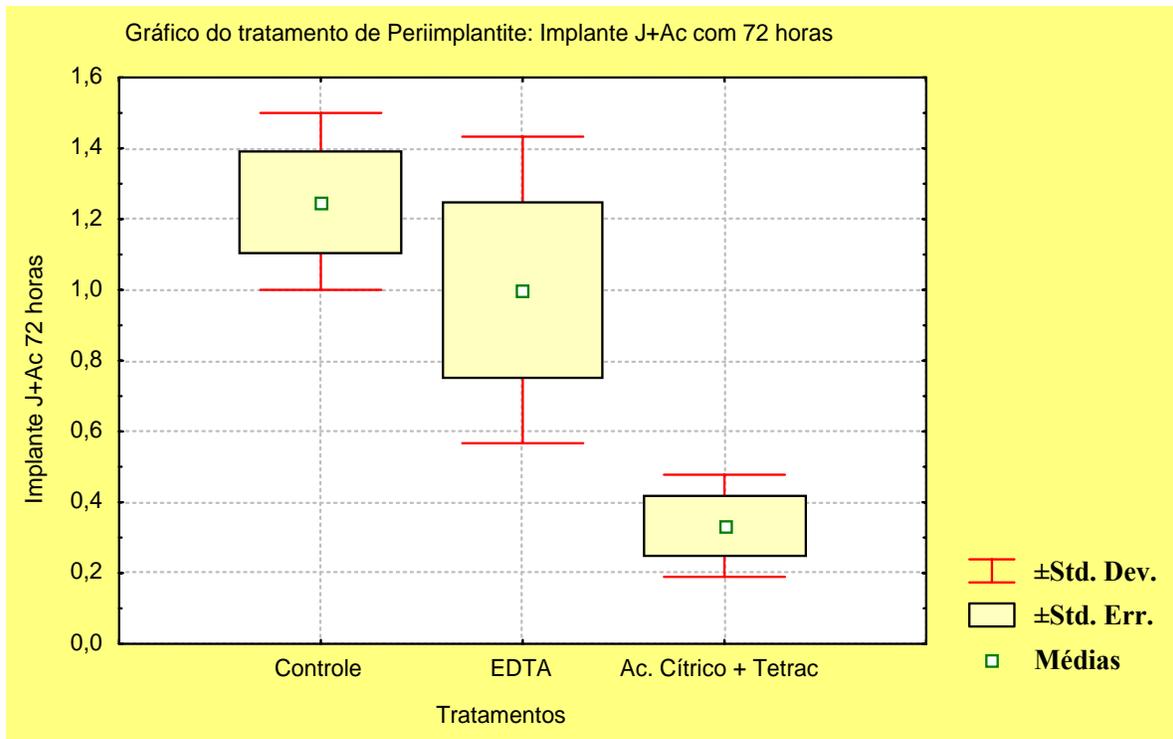


Figura 8: o gráfico mostra a diferença significativa entre o grupo controle o o grupo Ac. cítrico + tetraciclina ($p < 0,05$) e a ausência de significância entre o controle e o grupo EDTA

Levando-se em consideração somente os períodos analisados, observou-se que não houve um crescimento celular estatisticamente significativo de 48 para 72 horas, nem intra, nem entre os grupos. Tal fato sugere que não houve um significativo crescimento exponencial das células ósseas, exceção feita no grupo 1 tratado com ácido cítrico mais tetraciclina, que apresentou um crescimento celular bastante significativo ($p < 0,01$) e no grupo 2 tratado com EDTA que apresentou resultado semelhante ($p < 0,01$), figuras 09 e 10.

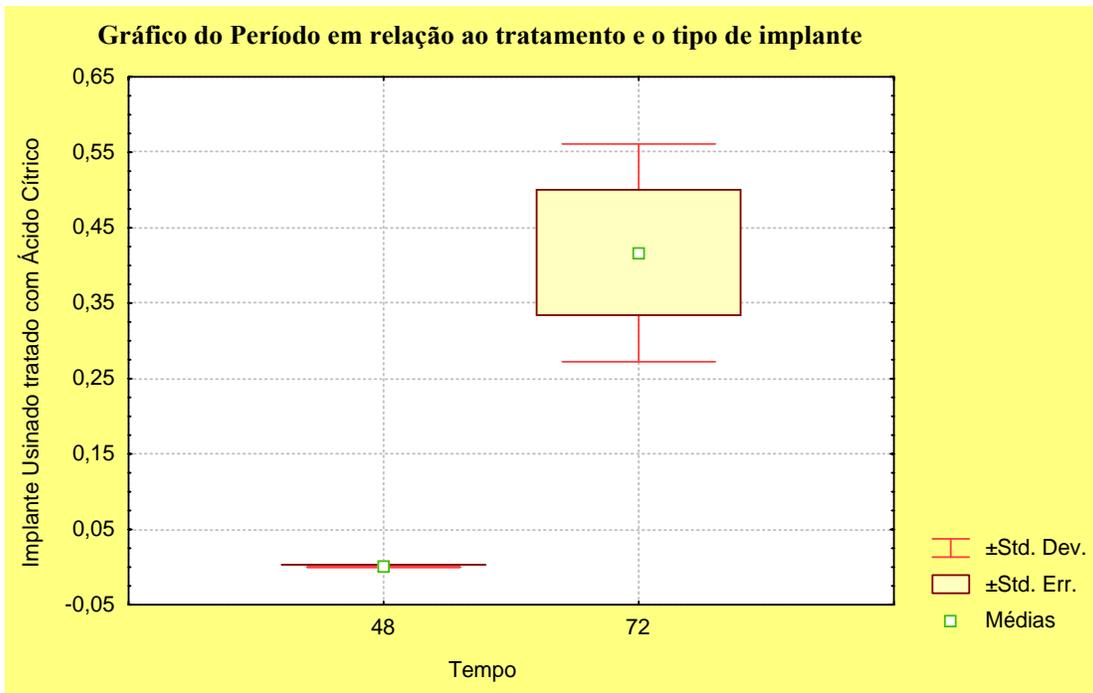


Figura 9: o gráfico mostra a diferença entre os períodos no grupo de implantes usinados tratados com ácido cítrico

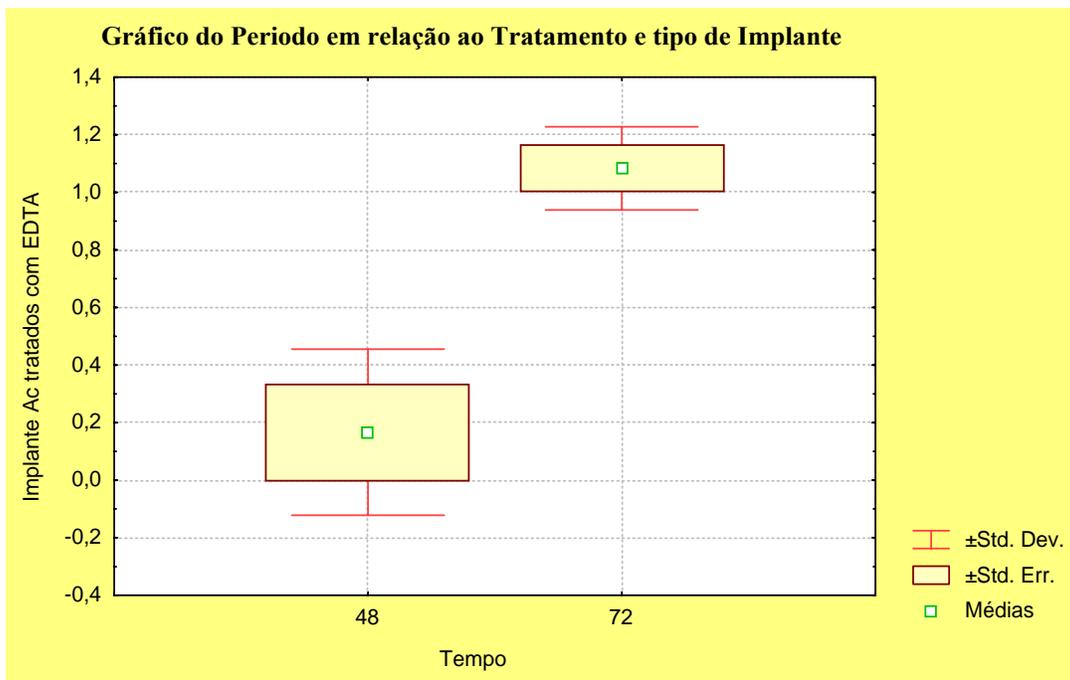


Figura 10: o gráfico mostra a diferença entre os períodos no grupo de implantes Ac tratados com EDTA

DISCUSSÃO

Muitas das técnicas utilizadas no tratamento das periimplantites foram trazidas dos tratamentos das doenças periodontais. As técnicas de descontaminação química da superfície radicular e seus efeitos sobre a mesma e sobre as células do ligamento periodontal vem sendo propostas e utilizadas desde o começo da década de 70 e até os dias dia de hoje ainda não se chegou a um consenso sobre a real necessidade desse tratamento, bem como qual dos produtos utilizados, para esse objetivo, seria o melhor para favorecer a reparação das estruturas periodontais perdidas ¹⁷.

Com isso pode-se discutir se os produtos transpostos dos tratamentos periodontais seriam realmente os produtos de escolha para o tratamento de doenças periimplantares, já que são estruturas completamente diferentes, contudo é de consenso geral que a descontaminação da superfície dos implantes expostos e a eliminação das endotoxinas bacterianas presentes em sua superfície são de vital importância para o sucesso de tratamentos de doenças periimplantares, como é o caso das técnicas reconstrutivas.

Trabalhos mostraram por meio de testes enzimáticos que o ácido cítrico, por si só, na presença de *P. gingivalis*, *P. intermédia* e *A. actinomycetemcomitans* não apresentou efeitos microbiológicos significantes ¹⁸. Trabalhos com fibroblastos demonstraram que a tetraciclina ácida pode não interferir na adesão e crescimento celular *in vitro*, porém previamente à chegada dos fibroblastos sobre a superfície dentária, dá-se início ao processo de cicatrização e que a presença da tetraciclina em concentrações elevadas pode interferir na função dos neutrófilos e conseqüentemente interferir em toda a cascata biológica de cicatrização. Tal fato acaba por inibir a formação de um tecido conjuntivo em áreas tratadas com tetraciclina ácida ⁶. Postula-se que a associação do ácido cítrico com a tetraciclina tem

como objetivo unir os fatores de anticolagenase, bacteriostáticos e de liberação prolongada do antibiótico (substatividade), com a capacidade de descalcificar calcificações presentes sobre superfícies e de remover agentes fogogenos bacterianos por parte do ácido cítrico^{8,11}.

Adicionalmente, pesquisas recentes têm demonstrado que o tratamento químico com EDTA apresenta uma considerável vantagem as superfícies dos implantes, isso se deve ao fato de ele possuir um pH neutro e evitando assim a necrose superficial dos tecidos adjacentes^{1,2,7}.

Todavia, tais estudos não analisaram os efeitos sobre os osteoblastos dessas substâncias, o que dificulta a comparação desta pesquisa com os correlatos da literatura.

A análise dos resultados, em um período inicial, em nível celular, ambos os tratamentos se apresentaram tóxicos as células, promovendo um alto índice de mortalidade das mesmas. Já com 72 horas a toxicidade desses tratamentos diminuiu significativamente, permitindo assim o restabelecimento das células ósseas e sua multiplicação. Fato comprovado pelo alto índice de crescimento no número de células no período entre 48 e 72 horas dos grupos experimentais quando comparado com os grupos controles (Figura 11).

Esses resultados permitem fazer algumas extrapolações clínicas, o fato de a toxicidade dos tratamentos diminuir significativamente com o passar do tempo é um indicativo de que essas terapias podem ser aplicadas em técnicas reconstrutivas sem grandes prejuízos a médio prazo para as estruturas adjacentes. Mesmo levando em consideração as afirmações de alguns autores quanto a baixa probabilidade de se conseguir uma reosseointegração, a aplicação tópica dessas substâncias antiinfectivas favoreceriam a diminuição do sulco periimplantar e a manutenção dos implantes a longo prazo^{9,16}.

A transposição dos resultados dessa pesquisa para a clínica pode esbarrar em algumas falhas inerentes a metodologia utilizada. O fato de não se poder contaminar a

superfícies dos implantes, prévio a realização dos tratamentos de periimplantite, pois isso inviabilizaria a realização posterior da cultura celular, é um fator que pode gerar variações no resultado obtido, bem como o desconhecimento da real efetividade no controle dos agentes patológicos por parte dos produtos utilizados.

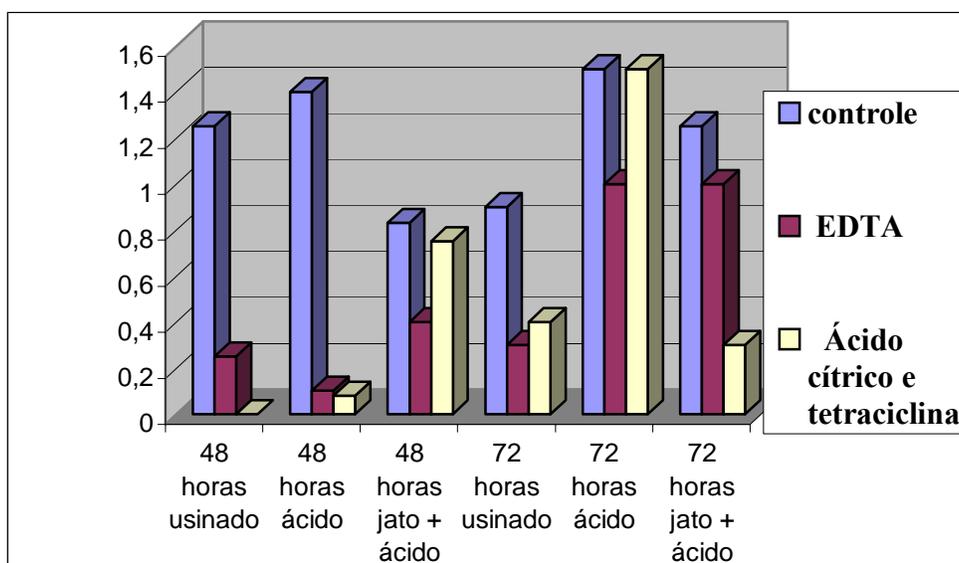


Figura 11: Gráfico mostrando a relação do número de células com os grupos, sobre cada tipo de superfície de implante

Outro fator a ser levado em consideração são as alterações que esses tratamentos promovem na superfície implantar e a inter-relação entre a energia de superfície dos diferentes implantes presentes no mercado e a capacidade destes em reter resíduos desses tratamentos nas suas superfícies, por que isso pode ser um fator favorável no combate a recolonização bacteriana na área contaminada e ao mesmo tempo pode ser desfavorável à colonização da superfície por osteoblastos²².

A capacidade dos tratamentos de periimplantite em alterar a superfície do titânio foi foco de estudo e foi verificado que os tratamentos testados não promoviam alterações na superfície do metal⁴. Todavia, a capacidade de retenção dos produtos, principalmente nos

implantes texturizados, ainda necessitam de maiores estudos. E talvez isso seja um fator que tenha gerado as diferenças no número de células entre os subgrupos EDTA e ácido cítrico mais tetraciclina, nos grupos de implantes com superfície texturizadas por ataque ácido e por jateamento mais ataque ácido. Porém no trabalho citado não foi avaliado se tais tratamentos, apesar de não promoverem alterações físicas aparentes na superfície do titânio, promovem um aumento ou diminuição na energia superficial do mesmo. Esse também é um fator que pode ter interferido a curto prazo na adesão dos osteoblastos sobre os implantes testados neste trabalho, o que pode ter gerado uma diminuição no número de células.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados é possível observar que a toxicidade dos tratamentos químicos periimplantares para osteoblastos se mostrou semelhantes, sendo os produtos testados tóxicos em um período inicial. Em um segundo momento essa toxicidade diminuiu. Portanto isso sugere *in vivo* que ao se promover uma terapia antiinfectiva a superfície dos implantes se tornará mais favorável à colonização por células osteoprogenitoras, isso favorece o restabelecimento da saúde periimplantar e a manutenção a longo prazo dos implantes dentários.

REFERÊNCIA

1. Blomlöf J, Lindskog S. Periodontal tissue-vitality after different etching modalities. **J. Clin. Periodont.**, 1995, 22:464-468.
2. Blomlöf J, Jansson L, Lindskog S, Lindskog S. Long-time etching at low pH jeopardizes periodontal healing. **J. Clin. Periodont.**, 1995, 22:459-463.
3. Damé JAM, Resende DRB, Benfatti CAM et al. Characterization of the topographic of Ti cp prototype implants submitted to similar treatment to those for decontamination in peri-implantitis. **Salusvita**, 2004, 22:353-362.
4. Drake DR, Paul J, Keller JC. Primary bacterial colonization of implant surface. **Int J. Oral Maxillofac. Implants**, 1999, 14:226-232.
5. Dennison DK, Huerzeler MB, Quinones C, Caffesse RG. Contaminated implant surfaces: an in vitro comparison of implant surface coating and treatment modalities for decontamination. **J. Periodontol.**, 1994, 65:942-948.
6. Frantz B, Polson A. Tissue integration with dentin specimens after demineralization using tetracycline. **J Periodontol.**, 1988, 59:714-721.

7. Grunder U et al. Treatment of ligadure-induced peri-implantitis using guided tissue regeneration: a clinical and histologic study in the beagle dog. **Int. J. oral Maxillofac. Implants**, 1993, 8:282-293.
8. Jeong S-N, Han S-B, Lee S-W, Magnusson I. Effects of tetracycline-containing gel and a mixture of tetracycline and citric-acid-containing gel on non cirurgical periodontal therapy. **J. Periodontol.**, 1994, 65:840-847.
9. Jovanovic SA, Spiekermann H. Bone regeneration around titanium dental implants in dehiscd sites: a clinical study. **Int. J. oral Maxillofac. Implants**, 1992, 7:233-245.
10. Kawahara D et al. Surface characterization of radio-frequency glow discharged and autoclaved titanium surface. **Int. J. oral Maxillofac. Implants**, 1996, 11:435-442.
11. Labahn R, Fahrenbach WH, Clark SM et al. Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning. **J. Periodontol.**, 1993, 64:689-693.
12. Mombelli A. Etiology, diagnosis, and treatment considerations in peri-implantitis. **Curr. opin. Periodont.**, 1997, 4:127-136.

13. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. **Periodont.** 2000, 1998, 17:63-76.
14. Quirynen M, Bollen CML, Papaioannou W, Eldere JV, Steenberghe D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. **Int J. Oral Maxillofac. Implants**, 1996, 11:169-178.
15. Quirynen M, Van Der Mei HC, Bollen CML, Schotte A, Marechal M, Doornbush, GI, Naert I, Busscher HJ, Steenberghe D. An *in vivo* study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology supra and subgingival plaque. **J. Dent. Res.** 1993, 72:1304-1309.
16. Persson LG et al. Guided bone regeneration in the treatment of peri-implantitis. **Clin. oral Implants Res.**, 1996, 7:366-372.
17. Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized *in situ*. I. Optimum range. **J. Peridontol.**, 1975, 46:646-655.
18. Renvert S, Dahlén G, Snyder B. Clinical and microbiological effects of subgingival antimicrobial irrigation with acid citric as evaluated by an enzyme immunoassay and culture analysis. **J. Peridontol.**, 1997, 68:346-352.

19. Rimondini L, Faré S, Branbilla E, Felloni A, Consonni C, Brossa F, Carrassi A. The effect of surface roughness on early *in vivo* plaque colonization on titanium. **J. Periodontol.**, 1997, 68:556-562.
20. Yanchun L, Shu XZ, Gray SD, Prestwidge GD. Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin sponge: growth of fibrous tissue *in vivo*. **J. Biomed. Mater. Res.**, 2004, 68A:142-149.
21. Zucchelli G, Sforza NM, Clauser C, Cesari C, Snetik M. Topical and systemic antimicrobial therapy in guided tissue regeneration. **J. Periodontol.**, 1999, 70:239-247.
22. Wolinsky LE, Camargo PM, Erard JC, Newman MG. A study of *in vitro* attachment of *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus* to saliva-treated titanium. **Int J. Oral Maxillofac. Implants**, 1989, 4:27-31.

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Concentração Implantodontia

**ANÁLISE DOS EFEITOS TÓXICOS DOS TRATAMENTOS DE
PERIIMPLANTITE NOS OSTEOLASTOS CULTIVADOS SOBRE
DIFERENTES TIPOS DE SUPERFÍCIES DE IMPLANTES**

Dissertação de Mestrado

Cesar Augusto Magalhães Benfatti

Florianópolis - 2006

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito dos tratamentos químicos de periimplantite nos osteoblastos cultivados sobre implantes com diferentes superfícies. Osteoblastos provenientes de uma cultura primária de ratos foram cultivados por 48 e 72 horas sobre implantes com superfície usinada (grupo 1), texturizada por ataque ácido (grupo 2) e por jateamento de partículas de óxido de alumínio mais ataque ácido (grupo 3), tratadas ou não com EDTA e ácido cítrico suplementado com tetraciclina. A toxicidade dos tratamentos de periimplantite foi determinada pela contagem do número de osteoblastos presentes na superfície dos implantes durante os dois períodos analisados. No período inicial os implantes submetidos aos tratamentos de descontaminação obtiveram um número de células significativamente menor do que os grupos controles, já com 72 horas houve uma tendência de igualar o número de células dos grupos experimentais quando comparados com os grupos controles. Os resultados mostram uma diminuição da toxicidade dos produtos testados com o passar do tempo e que após 48 horas essa toxicidade não é prejudicial à proliferação celular, sugerindo a viabilidade clínica da utilização desses produtos com o objetivo de tornar as superfícies implantares mais favoráveis aos tecidos. Contudo ainda serão necessários estudos adicionais para afirmar com segurança qual dos tratamentos é biologicamente melhor para cada tipo de superfície de implante e seus efeitos sobre a reparação tecidual *in vivo*.

Palavras chave: implante, periimplantite, tratamento químico e osteoblastos.

INTRODUÇÃO

Os implantes são atualmente o melhor e mais bem sucedido tratamento para a reposição de elementos dentários perdidos, contudo é comum se verificar a presença de inflamações ao redor destes. A presença de inflamação, mais a perda óssea ao redor dos implantes são sinais de que um quadro de doença periimplantar está instalado. Essa doença é responsável por gerar a perda da osseointegração, e por conseqüência inviabilizar a manutenção em boca de um grande número de implantes. Estudos mostraram que 10% dos implantes em fase de manutenção são acometidos por esse tipo de doença ¹². Um dos fatores responsáveis por isso é a presença de bactérias patogênicas, que assim como é verificado sobre a superfície dentária, se aderem aos implantes e promovem a migração para apical dos tecidos que os margeiam, promovendo a perda da osseointegração nas áreas acometidas pela doença ⁴.

A eliminação das bactérias patogênicas que colonizam a superfície implantar é fator primordial para o controle das doenças que os acometem, e por conseqüência o restabelecimento da saúde dos tecidos periimplantares. Com o objetivo de se conseguir uma desinfecção das superfícies dos implantes, e com isso possibilitar que o osso e o implante se reintegrem, vários tratamentos foram propostos, dentre eles é possível citar a descontaminação por meio da aplicação tópica de ácido cítrico, ácido cítrico suplementado com tetraciclina e EDTA em gel ²¹.

Existe um paradoxo na literatura quanto à possibilidade de reosseointegração, as técnicas reconstrutivas nos casos em que houve uma perda óssea e uma colonização da superfície implantar por bactérias. Clínica e radiograficamente é possível se averiguar a

formação de nova estrutura óssea, porém as pesquisas mostram que histologicamente não há um contato direto do osso com a superfície do implante que teria sido colonizada por bactérias, verificando a presença de um tecido fibroso entre o osso e essa superfície ^{9,13,16}. Um dos supostos fatores que interfeririam nessa reosseointegração osso e implante seria a dificuldade de descontaminação e a toxicidade dos tratamentos de limpeza das mesmas realizadas, que inibiriam a recolonização dessas áreas por células ósseas ¹⁰.

Essa preocupação aumentou ainda mais quando na década de noventa começaram a surgir no mercado implantes com superfícies texturizadas. Essa alteração na rugosidade superficial tem por objetivo aumentar o contato osso implante, principalmente em áreas de baixa densidade óssea e de enxertos ósseos, além de promover uma osseointegração mais rápida, elevando a previsibilidade nos casos de implantes imediatos com ou sem a colocação dos mesmos em função também imediatamente ^{14,15}. A texturização se dá por meio de tratamentos químicos e/ou físicos. Essas superfícies possuem uma topografia mais rugosa do que as que eram verificadas nos implantes submetidos somente ao processo de usinagem. As características topográficas dessas novas superfícies levaram os pesquisadores a sugerir que seria, devido ao aumento rugosidade e energia de superfície, maior a adesão bacteriana sobre as mesmas, contudo seria mais dificultosa sua descontaminação ^{19, 20}.

Recentes trabalhos têm demonstrado que a presença de bactérias patogênicas nas superfícies submetidas a texturização é similar a encontrada na usinada somente ¹⁵. E que os métodos de tratamento anti-infectivo dos diferentes tipos de superfícies não são estatisticamente significantes quando comparados entre si, entre os tipos de superfícies e de descontaminantes ⁶.

Um fator pouco discutido e foco de escassos estudos são as respostas celulares e teciduais que os tratamentos de periimplantites geram no osso, principalmente nas células osteoprogenitoras. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito dos tratamentos de periimplantite nas células ósseas cultivadas sobre implantes de titânio com diferentes tipos de superfícies.

MATERIAL E MÉTODOS

CULTIVO CELULAR

LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTURA:

Foi utilizada uma linhagem celular primária de osteoblastos oriunda de calvária de rato (*rattus norvegicus*), OSTEO II, que se encontrava na terceira passagem celular, estocada em nitrogênio líquido e protegida por dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma Chemical, C.O., St. Louis, MO, USA).

As células foram descongeladas em banho Maria a 37°C por 60 segundos, transferidas para placas de Petri de 75 cm², com 15 ml de meio de cultivo fresco e mantidas em estufa a uma temperatura de 37°C, em atmosfera úmida, contendo ar saturado em 5% de CO₂. Após as células aderirem, o meio foi trocado, isso ocorreu dentro de um período máximo de 24 horas para que os efeitos do DMSO não produzissem quaisquer alterações celulares. O crescimento dessas foi monitorado diariamente em microscópio de fase invertida e o meio de cultura trocado a cada dois ou três dias, sempre de acordo com o

metabolismo celular. A necessidade de troca do meio de cultura foi feita pelo método visual, com observação da vitalidade celular, coloração e aspecto do meio.

Na subconfluência, as células foram subcultivadas de acordo com a necessidade de novas placas. O meio de cultura foi removido, os implantes lavados duas vezes com PBS, sem cálcio e magnésio, pH 7,2 e então separadas com um ml de solução de tripsina (Sigma) a 0,25% com EDTA um mM (Sigma) durante aproximadamente cinco minutos. A tripsina foi inativada com meio de cultura fresco, quatro ml de Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), contendo ampicilina (0,025 g/L), estreptomicina (0,1 g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino. Então as células em suspensão foram contadas na câmara de Neubauer (hemocitômetro), para determinar a concentração de células por microlitro. Todos os procedimentos experimentais foram realizados sob capela de fluxo laminar.

DIVISÃO DOS GRUPOS

As amostras foram divididas em três grupos, cada grupo foi composto por três subgrupos com três implantes:

- Grupo I: implantes usinados (U)
 - o sem tratamento de periimplantite (controle)
 - o tratados com EDTA trissódico 24% em gel (três minutos)
 - o tratados com ácido cítrico pH 1, 50%, mais tetraciclina 5% em gel (três minutos)
- Grupo II: implantes com superfície texturizada por meio de ataque ácido (Ac)
 - o sem tratamento de periimplantite (controle)
 - o tratados com EDTA trissódico 24% em gel (três minutos)

- tratados com ácido cítrico pH 1, 50%, mais tetraciclina 5% em gel (três minutos)
- Grupo III: implantes com superfície texturizada por meio de jateamento de partículas de óxido de alumínio mais ataque ácido (J+Ac)
 - sem tratamento de periimplantite (controle)
 - tratados com EDTA trissódico 24% em gel (três minutos)
 - tratados com ácido cítrico pH 1, 50%, mais tetraciclina 5% em gel (três minutos)

PREPARO DAS AMOSTRAS

Semearam-se, em média, 1×10^4 osteoblastos por implante. Os implantes foram imobilizados por meio de grampos de aço presos no nível da primeira rosca, impedindo assim que os mesmos pudessem rolar ou se movimentar dentro dos poços dificultando a adesão e proliferação celular (figura 01). Após o assentamento dessas células (cinco minutos), os mesmos foram mantidos imersos em DMEM, contendo ampicilina (0,025 g/L), estreptomicina (0,1 g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino, em uma temperatura de 37°C e pressão atmosférica de 5% CO₂ com 95% ar, em placas de 6 poços (figuras 02 e 03).

As amostras foram submetidas á análise de proliferação celular após os períodos de 48 e 72 horas (n = 54).



Figura 1: Implante immobilizado por meio de grampo metálico estéril



Figura 2: Células sendo semeadas sobre a superfície do implante, 1×10^4 células

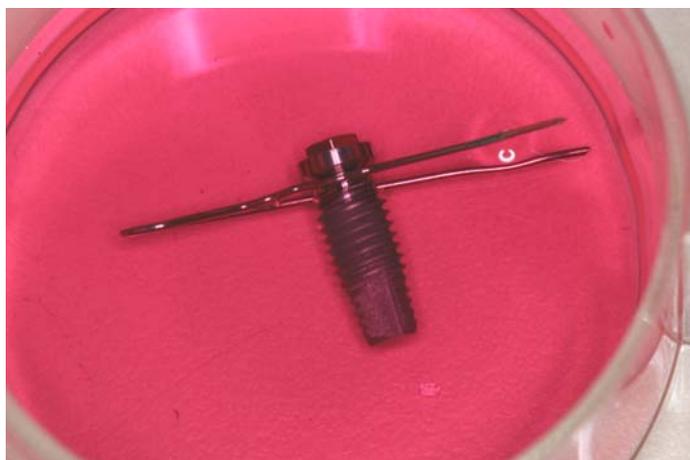


Figura 3: Implante totalmente submerso em meio de cultura, após cinco minutos das células semeadas.

CONTAGEM CELULAR

Realizou-se a semeadura das células sobre os implantes e aguardou-se o período experimental, separaram-se as células por meio da imersão desses dentro de um tubo de ensaio contendo um ml de tripsina, durante cinco minutos. Colocou-se então mais um ml de meio fresco e a suspensão de células foi centrifugada durante cinco minutos com uma velocidade de 300g. O precipitado foi ressuspensão em um ml de meio de cultura DMEM. Os dois lados da câmara de Neubauer receberam a suspensão e realizou-se a contagem celular com microscopia de luz (100x). Os números de células vivas foram contadas considerando o formato e a textura celular. A leitura de cada material foi realizada em duplicata e para efeito de análise dos resultados foi tirada a média dos dois valores (figuras 04 e 05).

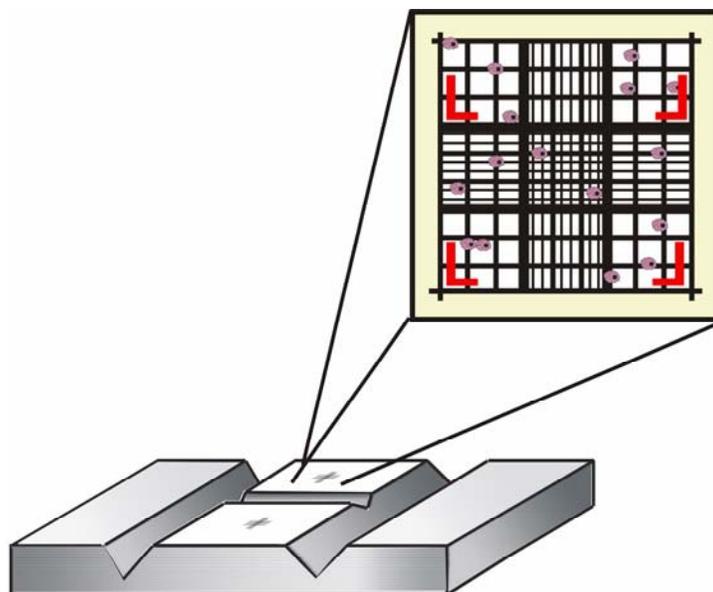


Figura 4: Desenho esquemático de um hemocítômetro; em maior aumento uma simulação da imagem visualizada no microscópio óptico, foram contadas somente as células presentes dentro dos quadrantes indicados (L)

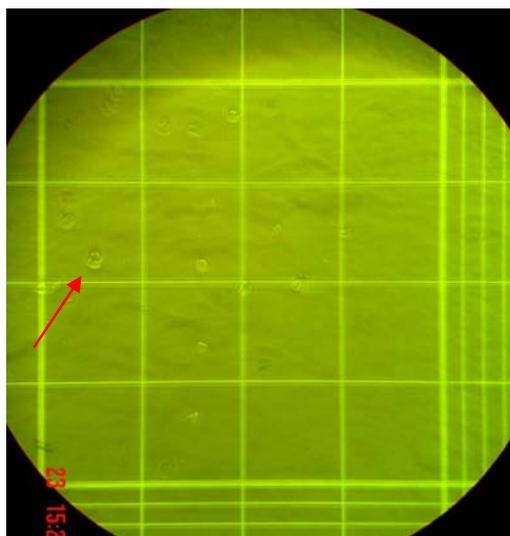


Figura 5: Imagem do hemocítômetro durante a contagem de osteoblastos, exemplificado pela seta (↑), (100x)

Para este artigo foi levado em consideração somente o número de células viáveis. O número de viabilidade celular é dado pelo total de células vivas contadas multiplicadas pela diluição realizada e por 10^4 , dividido pelo número de quadrantes contados (quadro 01).

$$\begin{array}{l} \text{Número total} \\ \text{de} \\ \text{Células viáveis} \end{array} = \frac{\text{Número total de células vivas x diluição x } 10^4}{\text{Número de quadrantes contados}}$$

Quadro 01: Número da viabilidade celular

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados através do teste ANOVA. Para os casos onde foram detectadas diferenças após esse teste, foi verificada a homogeneidade das variâncias segundo Bartlett e aplicado um teste de comparação entre médias segundo Tukey, o programa utilizado foi o Estatística 6.0.

RESULTADOS

Verificou-se que no período inicial, 48 horas, em todos os grupos, os controles apresentaram maior número de células (Figura 6 e 7). Exceto no grupo 3, no qual, incluindo o controle, se obteve um crescimento celular baixo e com ausência de significância estatística entre os grupos.

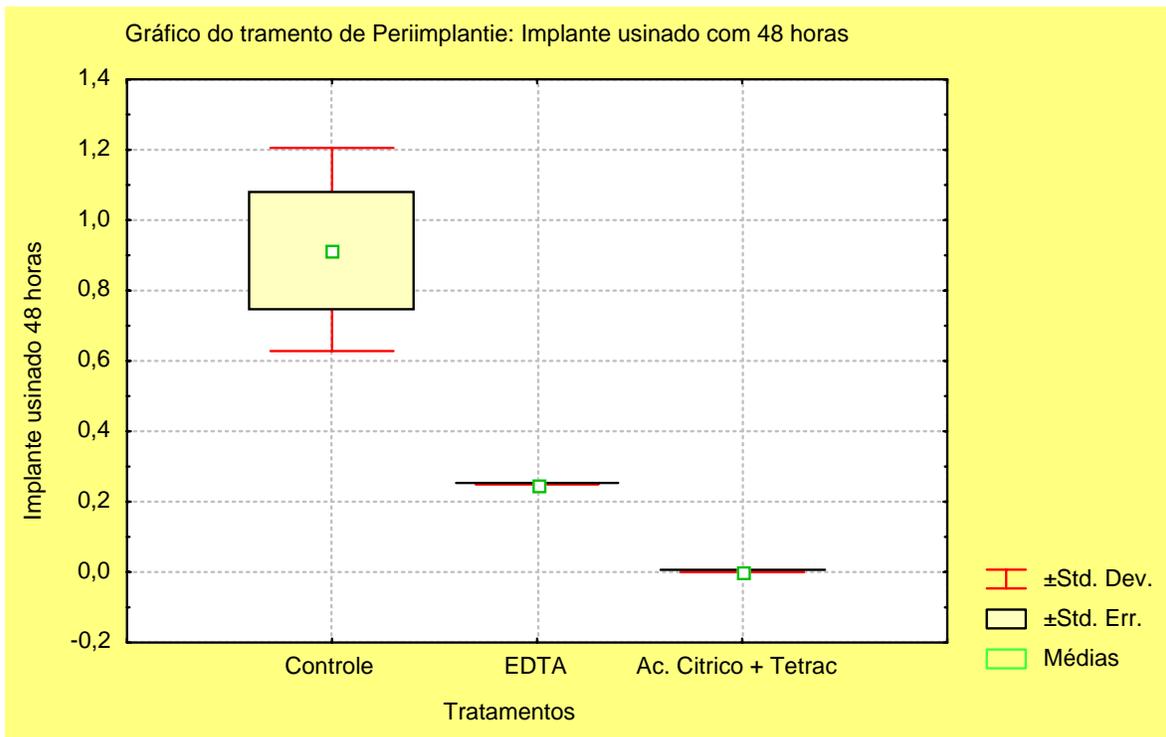


Figura 6: Gráfico mostrando a diferença estatística entre os grupos nos implantes usinados ($p < 0,01$)

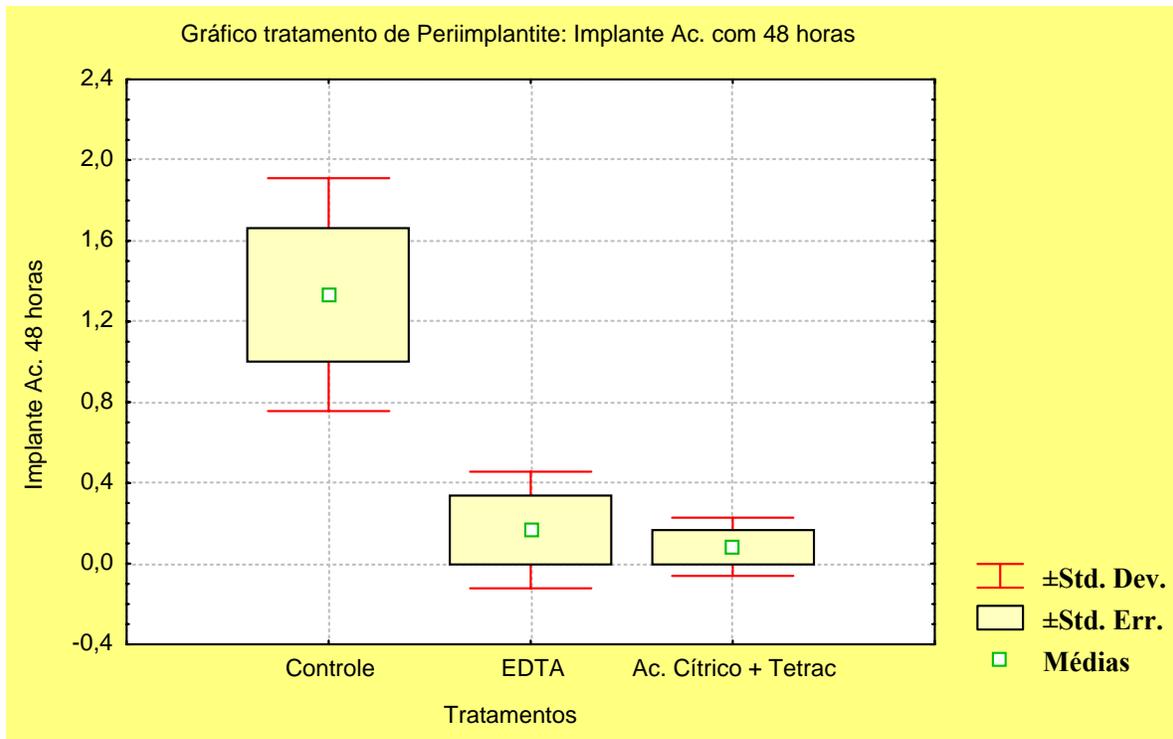


Figura 7: Gráfico mostrando a diferença estatística entre os grupos nos implantes Ac ($p < 0,05$)

Com 72 horas as diferenças no crescimento celular entre o controle e os subgrupos experimentais no grupo 1 se mantiveram significantes, enquanto que no grupo 2 a taxa de crescimento celular dos grupos experimentais foi elevada, a ponto de o número de células viáveis se tornarem estatisticamente semelhantes á do grupo controle. No caso do grupo 3 o subgrupo tratado com ácido cítrico mais tetraciclina manteve a diferença no número de células em relação ao controle, entretanto os implantes tratados com EDTA terminaram por igualar este número quando comparado com o mesmo (figura 08).

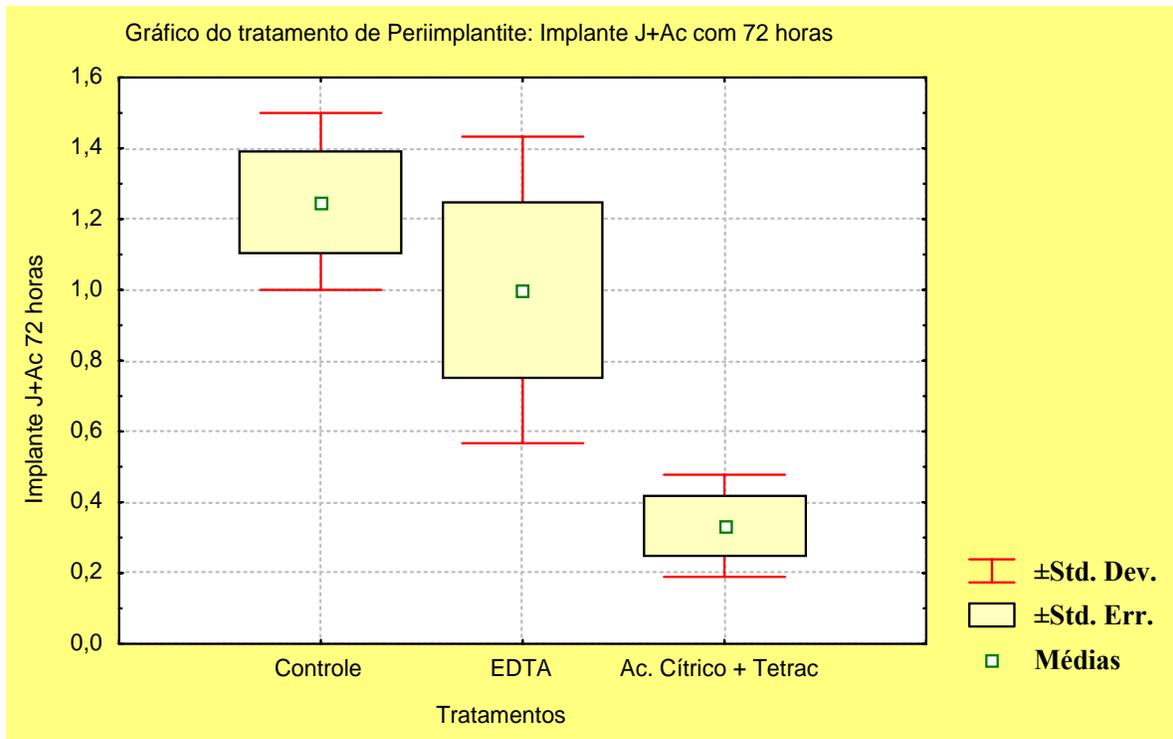


Figura 8: o gráfico mostra a diferença significativa entre o grupo controle o o grupo Ac. cítrico + tetraciclina ($p < 0,05$) e a ausência de significância entre o controle e o grupo EDTA

Levando-se em consideração somente os períodos analisados, observou-se que não houve um crescimento celular estatisticamente significativo de 48 para 72 horas, nem intra, nem entre os grupos. Tal fato sugere que não houve um significativo crescimento exponencial das células ósseas, exceção feita no grupo 1 tratado com ácido cítrico mais tetraciclina, que apresentou um crescimento celular bastante significativo ($p < 0,01$) e no grupo 2 tratado com EDTA que apresentou resultado semelhante ($p < 0,01$), figuras 09 e 10.

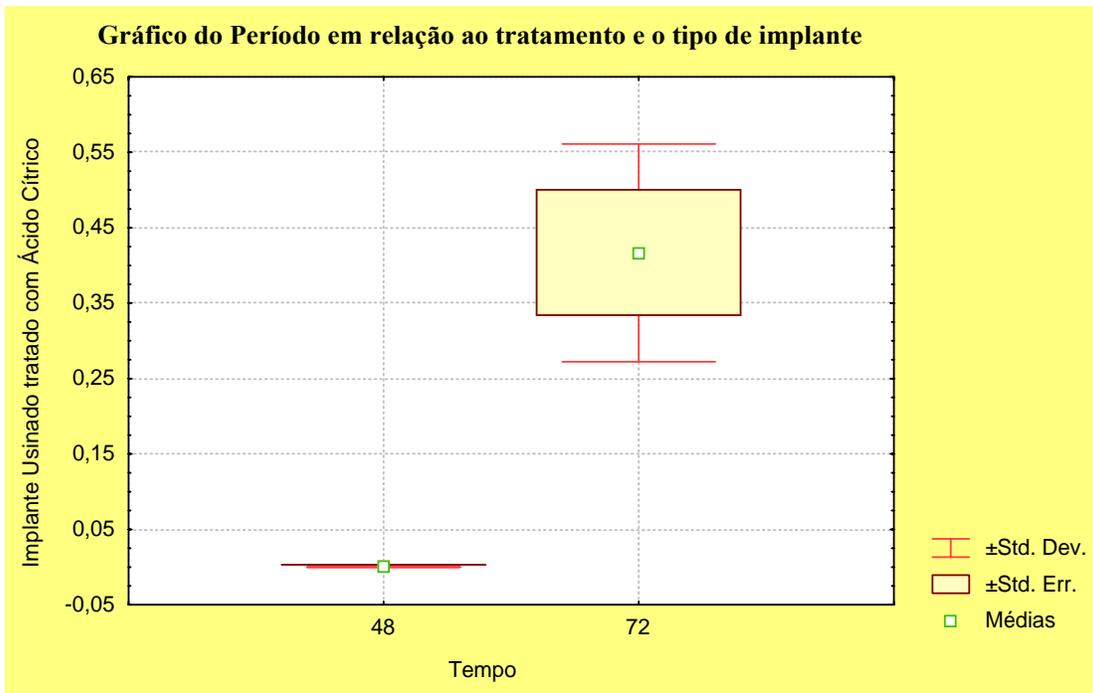


Figura 9: o gráfico mostra a diferença entre os períodos no grupo de implantes usinados tratados com ácido cítrico

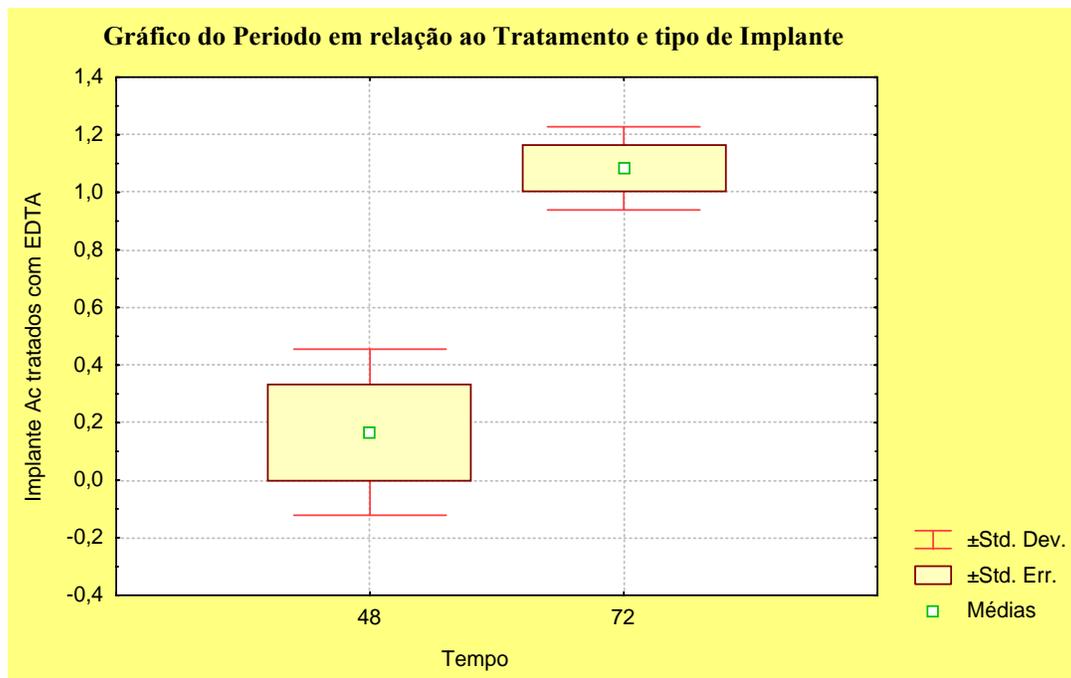


Figura 10: o gráfico mostra a diferença entre os períodos no grupo de implantes Ac tratados com EDTA

DISCUSSÃO

Muitas das técnicas utilizadas no tratamento das periimplantites foram trazidas dos tratamentos das doenças periodontais. As técnicas de descontaminação química da superfície radicular e seus efeitos sobre a mesma e sobre as células do ligamento periodontal vem sendo propostas e utilizadas desde o começo da década de 70 e até os dias dia de hoje ainda não se chegou a um consenso sobre a real necessidade desse tratamento, bem como qual dos produtos utilizados, para esse objetivo, seria o melhor para favorecer a reparação das estruturas periodontais perdidas ¹⁷.

Com isso pode-se discutir se os produtos transpostos dos tratamentos periodontais seriam realmente os produtos de escolha para o tratamento de doenças periimplantares, já que são estruturas completamente diferentes, contudo é de consenso geral que a descontaminação da superfície dos implantes expostos e a eliminação das endotoxinas bacterianas presentes em sua superfície são de vital importância para o sucesso de tratamentos de doenças periimplantares, como é o caso das técnicas reconstrutivas.

Trabalhos mostraram por meio de testes enzimáticos que o ácido cítrico, por si só, na presença de *P. gingivalis*, *P. intermédia* e *A. actinomycetemcomitans* não apresentou efeitos microbiológicos significantes ¹⁸. Trabalhos com fibroblastos demonstraram que a tetraciclina ácida pode não interferir na adesão e crescimento celular *in vitro*, porém previamente à chegada dos fibroblastos sobre a superfície dentária, dá-se início ao processo de cicatrização e que a presença da tetraciclina em concentrações elevadas pode interferir na função dos neutrófilos e conseqüentemente interferir em toda a cascata biológica de cicatrização. Tal fato acaba por inibir a formação de um tecido conjuntivo em áreas tratadas com tetraciclina ácida ⁶. Postula-se que a associação do ácido cítrico com a tetraciclina tem

como objetivo unir os fatores de anticolagenase, bacteriostáticos e de liberação prolongada do antibiótico (substatividade), com a capacidade de descalcificar calcificações presentes sobre superfícies e de remover agentes fogogenos bacterianos por parte do ácido cítrico^{8,11}.

Adicionalmente, pesquisas recentes têm demonstrado que o tratamento químico com EDTA apresenta uma considerável vantagem as superfícies dos implantes, isso se deve ao fato de ele possuir um pH neutro e evitando assim a necrose superficial dos tecidos adjacentes^{1,2,7}.

Todavia, tais estudos não analisaram os efeitos sobre os osteoblastos dessas substâncias, o que dificulta a comparação desta pesquisa com os correlatos da literatura.

A análise dos resultados, em um período inicial, em nível celular, ambos os tratamentos se apresentaram tóxicos as células, promovendo um alto índice de mortalidade das mesmas. Já com 72 horas a toxicidade desses tratamentos diminuiu significativamente, permitindo assim o restabelecimento das células ósseas e sua multiplicação. Fato comprovado pelo alto índice de crescimento no número de células no período entre 48 e 72 horas dos grupos experimentais quando comparado com os grupos controles (Figura 11).

Esses resultados permitem fazer algumas extrapolações clínicas, o fato de a toxicidade dos tratamentos diminuir significativamente com o passar do tempo é um indicativo de que essas terapias podem ser aplicadas em técnicas reconstrutivas sem grandes prejuízos a médio prazo para as estruturas adjacentes. Mesmo levando em consideração as afirmações de alguns autores quanto a baixa probabilidade de se conseguir uma reosseointegração, a aplicação tópica dessas substâncias antiinfectivas favoreceriam a diminuição do sulco periimplantar e a manutenção dos implantes a longo prazo^{9,16}.

A transposição dos resultados dessa pesquisa para a clínica pode esbarrar em algumas falhas inerentes a metodologia utilizada. O fato de não se poder contaminar a

superfícies dos implantes, prévio a realização dos tratamentos de periimplantite, pois isso inviabilizaria a realização posterior da cultura celular, é um fator que pode gerar variações no resultado obtido, bem como o desconhecimento da real efetividade no controle dos agentes patológicos por parte dos produtos utilizados.

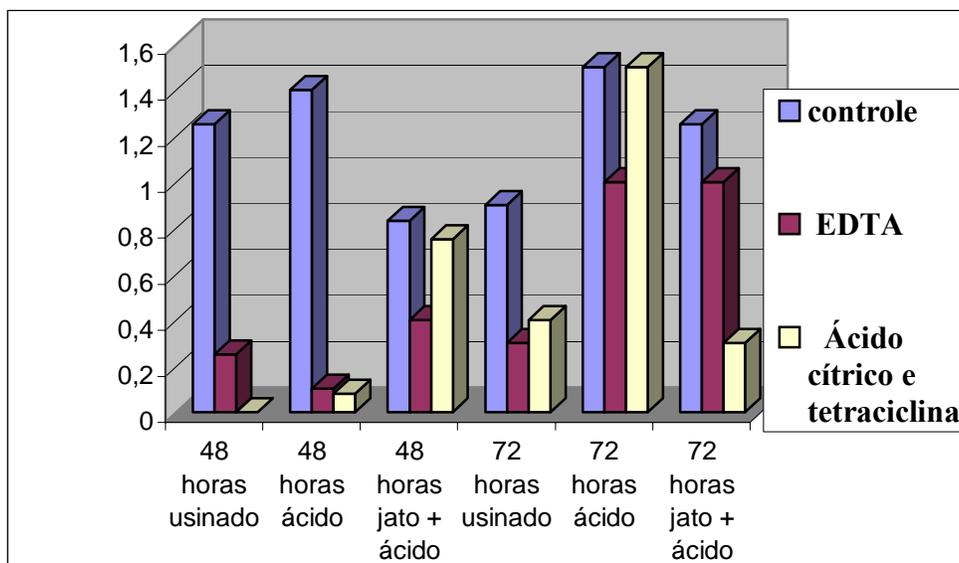


Figura 11: Gráfico mostrando a relação do número de células com os grupos, sobre cada tipo de superfície de implante

Outro fator a ser levado em consideração são as alterações que esses tratamentos promovem na superfície implantar e a inter-relação entre a energia de superfície dos diferentes implantes presentes no mercado e a capacidade destes em reter resíduos desses tratamentos nas suas superfícies, por que isso pode ser um fator favorável no combate a recolonização bacteriana na área contaminada e ao mesmo tempo pode ser desfavorável à colonização da superfície por osteoblastos²².

A capacidade dos tratamentos de periimplantite em alterar a superfície do titânio foi foco de estudo e foi verificado que os tratamentos testados não promoviam alterações na superfície do metal⁴. Todavia, a capacidade de retenção dos produtos, principalmente nos

implantes texturizados, ainda necessitam de maiores estudos. E talvez isso seja um fator que tenha gerado as diferenças no número de células entre os subgrupos EDTA e ácido cítrico mais tetraciclina, nos grupos de implantes com superfície texturizadas por ataque ácido e por jateamento mais ataque ácido. Porém no trabalho citado não foi avaliado se tais tratamentos, apesar de não promoverem alterações físicas aparentes na superfície do titânio, promovem um aumento ou diminuição na energia superficial do mesmo. Esse também é um fator que pode ter interferido a curto prazo na adesão dos osteoblastos sobre os implantes testados neste trabalho, o que pode ter gerado uma diminuição no número de células.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados é possível observar que a toxicidade dos tratamentos químicos periimplantares para osteoblastos se mostrou semelhantes, sendo os produtos testados tóxicos em um período inicial. Em um segundo momento essa toxicidade diminuiu. Portanto isso sugere *in vivo* que ao se promover uma terapia antiinfectiva a superfície dos implantes se tornará mais favorável à colonização por células osteoprogenitoras, isso favorece o restabelecimento da saúde periimplantar e a manutenção a longo prazo dos implantes dentários.

REFERÊNCIA

1. Blomlöf J, Lindskog S. Periodontal tissue-vitality after different etching modalities. **J. Clin. Peroidont.**, 1995, 22:464-468.
2. Blomlöf J, Jansson L, Lindskog S, Lindskog S. Long-time etching at low pH jeopardizes periodontal healing. **J. Clin. Peroidont.**, 1995, 22:459-463.
3. Damé JAM, Resende DRB, Benfatti CAM et al. Characterization of the topographic of Ti cp pTOTYPE implants submitted to similar treatment to those for decontamination in peri-implantitis. **Salusvita**, 2004, 22:353-362.
4. Drake DR, Paul J, Keller JC. Primary bacterial colonization of implant surface. **Int J. Oral Maxillofac. Implants**, 1999, 14:226-232.
5. Dennison DK, Huerzeler MB, Quinones C, Caffesse RG. Contaminated implant surfaces: an in vitro comparison of implant surface coating and treatment modalities for decontamination. **J. Periodontol.**, 1994, 65:942-948.
6. Frantz B, Polson A. Tissue integration with dentin specimens after demineralization using tetracycline. **J Periodontol.**, 1988, 59:714-721.

7. Grunder U et al. Treatment of ligadure-induced peri-implantitis using guided tissue regeneration: a clinical and histologic study in the beagle dog. **Int. J. oral Maxillofac. Implants**, 1993, 8:282-293.
8. Jeong S-N, Han S-B, Lee S-W, Magnusson I. Effects of tetracycline-containing gel and a mixture of tetracycline and citric-acid-containing gel on non cirurgical periodontal therapy. **J. Periodontol.**, 1994, 65:840-847.
9. Jovanovic SA, Spiekermann H. Bone regeneration around titanium dental implants in dehiscid sites: a clinical study. **Int. J. oral Maxillofac. Implants**, 1992, 7:233-245.
10. Kawahara D et al. Surface characterization of radio-frequency glow discharged and autoclaved titanium surface. **Int. J. oral Maxillofac. Implants**, 1996, 11:435-442.
11. Labahn R, Fahrenbach WH, Clark SM et al. Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning. **J. Periodontol.**, 1993, 64:689-693.
12. Mombelli A. Etiology, diagnosis, and treatment considerations in peri-implantitis. **Curr. opin. Periodont.**, 1997, 4:127-136.

13. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. **Periodont.** 2000, 1998, 17:63-76.
14. Quirynen M, Bollen CML, Papaioannou W, Eldere JV, Steenberghe D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. **Int J. Oral Maxillofac. Implants**, 1996, 11:169-178.
15. Quirynen M, Van Der Mei HC, Bollen CML, Schotte A, Marechal M, Doornbush, GI, Naert I, Busscher HJ, Steenberghe D. An *in vivo* study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology supra and subgingival plaque. **J. Dent. Res.** 1993, 72:1304-1309.
16. Persson LG et al. Guided bone regeneration in the treatment of peri-implantitis. **Clin. oral Implants Res.**, 1996, 7:366-372.
17. Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized *in situ*. I. Optimum range. **J. Peridontol.**, 1975, 46:646-655.
18. Renvert S, Dahlén G, Snyder B. Clinical and microbiological effects of subgingival antimicrobial irrigation with acid citric as evaluated by an enzyme immunoassay and culture analysis. **J. Peridontol.**, 1997, 68:346-352.

19. Rimondini L, Faré S, Branbilla E, Felloni A, Consonni C, Brossa F, Carrassi A. The effect of surface roughness on early *in vivo* plaque colonization on titanium. **J. Periodontol.**, 1997, 68:556-562.
20. Yanchun L, Shu XZ, Gray SD, Prestwidge GD. Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin sponge: growth of fibrous tissue *in vivo*. **J. Biomed. Mater. Res.**, 2004, 68A:142-149.
21. Zucchelli G, Sforza NM, Clauser C, Cesari C, Snetik M. Topical and systemic antimicrobial therapy in guided tissue regeneration. **J. Periodontol.**, 1999, 70:239-247.
22. Wolinsky LE, Camargo PM, Erard JC, Newman MG. A study of *in vitro* attachment of *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus* to saliva-treated titanium. **Int J. Oral Maxillofac. Implants**, 1989, 4:27-31.