

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e

Parasitologia Aplicadas

A influência do nano-recobrimento de Cálcio e
Fósforo no processo de osteogênese *in vitro*

Camilla Christian Gomes Moura

Uberlândia

Julho 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

A influência do nano-recobrimento de Cálcio e
Fósforo no processo de osteogênese *in vitro*

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor.

Camilla Christian Gomes Moura

Orientador (a): Prof. Dra. Maria Aparecida de Souza

Co-orientador (a): Prof. Dra. Paula Dechichi

Uberlândia

Julho 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M929j Moura, Camila Christian Gomes, 1979-
A influência do nano-recobrimento de cálcio e fósforo (Ca-P) no
processo de osteogênese in vitro / Camila Christian Gomes Moura. -
2009.

63 f. : il.

Orientadora: Maria Aparecida de Souza.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunidade celular - Teses. 2. Materiais biomédicos - Teses. I.
Souza, Maria Aparecida de. II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
III. Título.

CDU: 576.3:612.017

Agradecimentos

Existem **pessoas especiais** na concretização desta etapa....deste sonho!

Porém, existem também **pessoas essenciais**, que deram o seu melhor, que fizeram deste desafio um batalha de grandes guerreiras....sem hora para parar, sem medir esforços!

E essas guerreiras têm nome: **Paula Dechichi, Flaviana Soares Rocha e Maria Aparecida de Souza.**

Paula, mesmo diante de todas as adversidades, você esteve sempre disposta a ajudar com uma palavra amiga, corrigindo textos com a doçura de quem escreve um romance, e com os exemplos de moral e ética.

Flavi, a pequena enorme vencedora! Essa é o tipo de pessoa que não sabe esperar, que está sempre à frente de tudo, uma comandante nata! Faz tudo com amor e dedicação. Essa tese não é minha, é nossa!...e você, melhor que ninguém sabe sonhar junto e fazer acontecer!

Cida, a orientadora disposta a aceitar desafios. Da Leishmania aos osteoblastos, fluido crevicular, cimentos endodônticos. A sua coragem me fez estar aqui hoje! Que orientadora sairia da sua linha de pesquisa para que a orientada pudesse desenvolver aquilo que ela realmente gostaria, que tem afinidade? Sempre com pensamento positivo, disposta a dedicar horas de trabalho e abrir mão de finais de semana. Um enorme coração e capacidade de trabalho reunidas!

A vocês três meu eterno agradecimento!

Existe alguém que também não poderia ser esquecido....que foi extremamente importante na concretização desse trabalho: **Darceny Zanetta Barbosa**. Ele operava os pacientes, corria atrás do que fosse possível e, algumas vezes conseguiu o que parecia impossível....Cada sonho, por mais maluco que parecesse, ele apoiou. **Darça**, apenas os que te conhecem de verdade sabem a pessoa maravilhosa que você é!

Mas esse doutorado não gerou apenas artigos e uma tese...me deu a oportunidade de conhecer pessoas fantásticas, vivenciar experiências incríveis, cuja descrição não cabe no capítulo de material e métodos. Uma dessas pessoas que vão ficar na memória, que parecem colocadas na sua vida pelo destino chama-se **Dr. Pablo Peixoto**. Doce, inteligente, prestativo. Meu suporte na New York University!

Também não poderia deixar de agradecer ao **Prof. Dr. Paulo Coelho**, meu orientador no doutorado sanduíche, que me deu a oportunidade de vivenciar a experiência única de conhecer outra Universidade, outro país, outra cultura. E a **Profª Drª Cristina Teixeira**, a portuguesa que abriu as portas de seu laboratório para mim, sem qualquer tipo de restrição.

A pessoas especiais que conheci na Universidade de New York entre elas, Lwin Mont Thant e Carmen Chisholm.

A muitas outras pessoas cabem agradecimentos....

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, Prof^a Dr^a Eloísa Ferro, Prof^a Dr^a Janethe Pena.

Vocês assistiram de perto todos os meus passos, me apoiaram e defenderam quando era preciso. São justos, honestos, exemplos a serem seguidos.

Prof. Dr. Ernesto Taketomi, pela gentileza e prestatividade.

As **secretárias do PIPA** e as minhas **colegas da Histologia**, que me acompanharam mesmo que não tão de perto durante os últimos anos, mas que tenho certeza sempre torceram por mim!

Aos **colegas do Biomol**, especialmente ao **Alexandre e a Patrícia de Castilhos**

Às orientadas de iniciação científica que tomei para mim...**Claudinha Moura e Carla Siqueira.**

A **Isabel Pane** por ter me hospedado em sua casa durante os meses em que estive nos Estados Unidos.

À minha família e amigas que abriram mão da convivência, mas sempre torceram por mim, pelo meu sucesso!

E a DEUS que colocou todas essas pessoas na minha vida, e meu deu todas as oportunidades para que eu lutasse pelos meus sonhos!

Cabe agradecer também à Fapemig pela concessão da bolsa de doutorado e financiamento do projeto, e à CAPES pela Bolsa PDEE (doutorado Sanduíche).

Sumário

	Pag.
1. Resumo.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introdução.....	3
4. Revisão da Literatura	
4.1. Implantologia.....	5
4.2. Histofisiologia do Tecido Ósseo.....	6
4.3. Reparo Ósseo.....	7
4.4. Osteogênese <i>in vitro</i>	10
4.5. Interações entre células mononucleares, osteoblastos e implantes.....	12
4.6. Influência da superfície dos implantes no reparo ósseo.....	15
5. Objetivos.....	17
6. Materiais e métodos.....	18
6.1. Obtenção e caracterização dos discos de titânio.....	18
6.2. Obtenção das culturas de células humanas.....	18
6.3. Obtenção das células osteogênicas.....	18
6.4. Cultura primária de células osteogênicas.....	19
6.5. Cultura das células osteogênicas sobre a superfície do titânio.....	20
6.6. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	20
6.7. Cultura primária de células mononucleares do sangue periférico.....	20
6.8. Co-cultura de mononucleares e células osteogênicas.....	21
6.9. Análise da viabilidade celular.....	21
6.10. Análise da morfologia celular ao Microscópio eletrônico de varredura.....	21
6.11. Reação de imunofluorescência para Osteopontina.....	22
6.12. Reação de imunofluorescência para Fosfatase Alcalina (ALP)	22
6.13. Análise quantitativa das imunomarcações.....	23
6.14. Dosagem das citocinas.....	23

6.15. Análise estatística.....	24
7. Resultados.....	25
7.1. Viabilidade e adesão celular.....	25
7.2. Análise morfológica ao Microscópio Eletrônico de Varredura.....	26
7.3. Análise ao microscópio de Fluorescência.....	28
7.4. Quantificação das citocinas	34
8. Discussão.....	45
9. Conclusões.....	52
10. Referências Bibliográficas.....	53
12 Anexo I (Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa).....	62
13. Anexo II (Termo de Consentimento).....	63

Lista de abreviaturas

ALP – Fosfatase Alcalina

BMP – Proteína Morfogenética Óssea

BSA – Soro Albumina Bovina

BSP – Sialoproteína óssea

DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco

EDTA – Ácido Diaminotetracético

IL1 – Interleucina 1

IL10 – Interleucina 10

IL17 – Interleucina 17

IL6 – Interleucina 6

IL8 – Interleucina 8

LPS – Lipopolissacarídeo

MID – Meio Indutor de Diferenciação

OC – Osteocalcina

OPN – Osteopontina

PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PHSA – Plasma Spray de Hidroxiapatita

TBS - Tampão Tris-Borato

TGFβ – Fator de Crescimento Beta

TNFα – Fator de Necrose Tumoral Alfa

1. Resumo

Estudos *in vivo* têm demonstrado resultados favoráveis para os implantes de titânio com coberturas de cerâmica bioativa de reduzidas dimensões (nanométrica), quando comparada ao método tradicional de deposição por meio de plasma spray de hidroxiapatita (PHSA). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de uma cobertura uniforme de biocerâmica, em escala nanométrica, gerando superfícies moderadamente rugosas, sobre células osteogênicas e mononucleares (PBMC) humanas cultivadas isoladas ou em cocultura. Para isso, as células foram plaqueadas sobre três superfícies: usinada (grupo S1), jateada com óxido de alumínio seguido por subtração ácida (grupo S2), e jateada/subtraída seguida por deposição assistida por feixe iônico de Ca e P amorfo na ordem de 300-500 nm (grupo S3). Nas culturas de mononucleares (PBMC) e células osteogênicas foram realizadas avaliações da adesão, viabilidade celular e morfologia. Também foram realizadas imunolocalização das proteínas osteopontina (OPN) e fosfatase alcalina (ALP) na cultura de células osteogênicas e nas coculturas, e dosagem de citocinas (IL1 β , TGF β 1, IL17, IL10). Os resultados mostraram que o tratamento de superfície não interfere na viabilidade dos PBMC e das células osteogênicas ($p > 0,05$), embora a adesão de células osteogênicas tenha variado em função da superfície e do tempo. Em 24 horas, os grupos S2 e S3 apresentaram os melhores resultados, com maiores taxas de adesão que o grupo S1 ($p < 0,001$). Aos 7 dias, o grupo S1 apresentou um maior número de células aderidas que o grupo S3 ($p < 0,05$). Em relação à morfologia, os PBMC mostraram-se mais espalhados no grupo S1, enquanto as células osteogênicas e da cocultura apresentaram morfologia similar nas três superfícies nos diferentes tempos experimentais. No entanto, ao comparar as células osteogênicas e cocultura, estas apresentaram-se geralmente menores e menos espalhadas. A porcentagem de células osteogênicas mostrando marcação intracelular para OPN foi significativamente maior em S3 quando comparado à S1 ($p < 0,03$), não apresentando diferenças significativas na cocultura. A porcentagem de células mostrando marcação intracelular para ALP aos 7 dias foi significativamente maior no grupo S2 comparado ao grupo S1, tanto na cultura de células osteogênicas como na cocultura ($p < 0,05$). Aos 14 dias, na cultura de células osteogênicas, não foram observadas diferenças na % de marcação intracelular para ALP entre os grupos, enquanto na cocultura foram detectadas diferenças entre os grupos S2 e S3 ($p > 0,09$). Os níveis das citocinas variaram para cada cultura em função do tempo e da superfície, não apresentando um padrão de secreção. Os resultados do presente estudo indicam que composição e a textura da superfície influenciam os eventos iniciais da osteogênese *in vitro* e que a produção das citocinas é modulada pelas interações celulares sobre essas superfícies.

Palavras-chave: implante, titânio, osteoblasto, nanotecnologia

2. Abstract

In vivo studies have reported that reduced dimensions bioactive ceramic coating overcomes the advantages of the PHSA. The aims of this study were to determine the effect of a uniform bioceramic coating in the nanothickness range onto a moderately rough surface on human harvested bone cells cultivated isolated or in coculture (osteogenic cells and PBMC). The cells were plated over titanium as-machined (S1) surfaces, alumina-blasted/acid etched surfaces (S2), and alumina-blasted/acid-etched + 300-500 nm thickness amorphous Ca e P based coating obtained by ion beam assisted deposition (S3) and evaluated regarding viability, adhesion, morphology, cytokines quantification (IL1 β , TGF β 1, IL17, IL10) and immunolocalization of osteopontin (OPN) and alkaline phosphatase (ALP). The results showed that the surface treatment did not interfere on cell viability of PBMC cell culture or osteogenic cells ($p > 0.005$), though the adhesion of osteogenic cells have demonstrated a different pattern for each surface. At 1 day, S2 and S3 showed the better results, showing greater adhesion than the S1 surface ($p < 0.001$). At 7 days the S1 surface showed a significantly higher adhesion than the S3 surface ($p < 0.005$). The cell morphology evaluated on PBMC cultures showed spread morphology in S1 group. The osteogenic cells and the coculture showed a similar pattern for the three surfaces in the evaluated times. However, when compared both cell cultures, coculture looked like less spread and smaller than osteogenic cells. The % of osteogenic cells showing intracellular label for OPN at day 1 was significantly higher for the S3 surface compared to the S1 surface ($p < 0.03$), not showing differences in coculture. The % of ALP intracellular labeling at 7 days was significantly higher for the S2 surface compared to the S1 surface ($p < 0.0065$), the same characteristic was observed on coculture ($p < 0.05$). At 14 days, no differences in % ALP labeling was observed in osteogenic cells between the surfaces ($p > 0.09$). However in coculture % ALP labeling was significantly higher for the S3 group compared to the S2 group ($p < 0.005$). Regarding the cytokine levels were not observed a pattern for osteogenic cells, monocytes or coculture. The cytokine levels ranged among the three groups (S1, S2, S3) for each cell culture. Probably, cell interactions and cell surface contact have had an important effect on cytokine release. These results indicate that surface composition and texture influence the early events related to *in vitro* osteogenesis and that the cytokine production probably was modulated by cell interactions.

Keywords: implant, titanium, osteoblast, nanotechnology

3. Introdução

A bioengenharia tecidual tem como objetivo a reconstituição ou regeneração de tecidos e órgãos. Existem relatos, desde 1938, de tentativas de cultura de órgãos em laboratório, mas somente em 1970 surgiram as primeiras atividades científicas significativas. Estes esforços pioneiros foram ampliados nas últimas décadas com o advento da engenharia tecidual e medicina regenerativa, com aplicações em reparo de pele, osso, entre outras (AHSAN & NEREM, 2005).

O desenvolvimento de tecnologias na área de bioengenharia tem impulsionado a indústria de implantes médicos e odontológicos. Esta indústria está sofrendo uma revolução por meio de contínuos avanços na área de biologia celular e molecular, com o surgimento de uma nova geração de implantes médicos e terapias relacionadas (SATO & WEBSTER, 2004). Nos Estados Unidos, na década de 90, eram realizados anualmente cerca de 300.000 implantes de joelho e quadril, e 100.000 a 300.000 implantes dentais (PUELO & NANCI, 1999). Atualmente, o número de implantes biomédicos vem crescendo muito, influenciado pelo aumento nas taxas de sucesso clínico e redução nos custos.

Titânio comercialmente puro e ligas de titânio são os materiais mais utilizados em implantes médicos, veterinários e odontológicos. Apesar de suas excelentes propriedades físicas como ductibilidade, resistência à tensão e fadiga (XIE *et al.*, 2005; COELHO & LEMONS, 2008), perdas assépticas de implantes na medicina humana ainda são problemas importantes (YAO *et al.*, 2005). No entanto, os mecanismos responsáveis pela perda de implantes adequadamente instalados ainda não estão completamente esclarecidos. Investigações em nível celular têm auxiliado a compreensão do papel dos macrófagos e osteoblastos nos fenômenos que ocorrem na interface osso-implante.

Um caminho para melhorar as taxas de sucesso dos materiais a base de titânio é alterar as propriedades de superfície dos implantes, permitindo uma melhor adsorção inicial das proteínas plasmáticas, favorecendo as interações celulares na interface com o material implantado (SELA *et al.*, 2007; POPAT *et al.*, 2007). Os eventos iniciais imediatamente após a instalação dos implantes parecem ter papel importante no prognóstico, o que tem influenciado a indústria de biomateriais a desenvolverem implantes com vários tipos de tratamento de superfície, tanto em micro como em nanoescala (YAO *et al.*, 2005; SATO & WEBSTER, 2009; COELHO *et al.*, 2009 A).

A topografia e a composição química parecem controlar as funções celulares, tornando o micro-ambiente mais favorável à osseointegração (DAVIES, 2003; COELHO *et al.*, 2009

A). Esses conhecimentos têm impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento de superfícies bioativas, capazes de mimetizar o microambiente encontrado *in vivo*, e supostamente capazes de alterar o fenótipo celular, conduzindo a diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos, acelerando a neoformação óssea ao redor dos implantes e o processo de biomineralização (DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; COELHO *et al.*, 2009 A).

Considerando os fatores expostos acima, o presente estudo avaliou o efeito de incorporações nanométricas de biocerâmicas (Cálcio e Fósforo amorfo na ordem de 300-500 nm) sobre eventos chaves no processo de osteogênese *in vitro* e na liberação de mediadores celulares, num modelo de cocultura. Estudos desta natureza se baseiam na interação célula-célula e também na interação célula-superfície, e buscam compreender melhor os efeitos que superfícies bioativas exercem sobre os eventos iniciais do reparo ósseo, onde coexistem células inflamatórias como, por exemplo, mononucleares do sangue periférico, e células osteogênicas em diferentes estágios de diferenciação.

4. Revisão da Literatura

4.1 Implantologia

A implantodontia representa um dos maiores avanços da Odontologia nos tempos recentes. A busca por um substituto o mais próximo possível do elemento dental perdido, fez com que diferentes sistemas de implantes, utilizando os mais diversos materiais fossem utilizados, como o implantes agulhados, subperiostais e laminados (AMARANTE & LIMA, 2001; ALBREKTSSON, 2005).

Esses implantes odontológicos baseavam-se no empirismo e fracassaram devido à falta de estudos clínicos e científicos controlados. Entretanto, na década de 60, P.-I. Branemark e colaboradores, apoiados em pesquisas básicas e clínicas, iniciaram o desenvolvimento de um novo sistema de implantes. Esse novo sistema de implantes baseava-se numa ancoragem direta no tecido ósseo intacto, sem a interposição de tecido mole, denominada osseointegração (AMARANTE & LIMA, 2001; SIMON & WASTON, 2002) Inicialmente não foi possível demonstrar o fenômeno de osseointegração devido à ausência de equipamento que permitisse cortar o tecido ósseo intacto, sem a remoção do implante metálico, o que só foi demonstrado claramente por Schroeder e colaboradores em 1976 (ALBREKTSSON, 2005).

Estudos longitudinais demonstraram altas taxas de sucesso com os implantes de titânio desde que adequadamente utilizados (DAVIES, 2000; ALBREKTSSON, 2005). Baseados no protocolo original de Branemark e colaboradores, novos sistemas de implantes foram desenvolvidos, com variações no desenho do parafuso, composição do titânio, topografia e tratamento de superfície (AMARANTE & LIMA, 2001; BRUNETTE & CHEHROUDI, 1999; DAVIES, 2000). Além de modificações na rugosidade, os tratamentos de superfície podem alterar a composição química por meio da incorporação de revestimentos cerâmicos de hidroxiapatita ou tricalcio-fosfato (COELHO & LEMONS, 2008). Estes revestimentos resultam em maiores taxas de contato osso-implante e maior torque para remoção dos mesmos (COELHO & LEMONS, 2008; COELHO *et al.*, 2009 A, B), quando comparados às superfícies usinadas ou com microtopografia, embora não se conheça exatamente os eventos biológicos responsáveis por essas diferenças (COELHO *et al.*, 2009).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm buscado avaliar os biomateriais utilizados na implantologia e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no fenômeno de osseointegração (DAVIES, 2000; DAVIES, 2003), buscando acelerar o processo de reparo (COELHO *et al.*, 2009 A). Apesar dos avanços nas pesquisas, etapas iniciais da interação

tecido ósseo/titânio ainda não estão completamente esclarecidas, aspecto que pode ser explorado por meio da associação entre pesquisas em bases biológicas e implantologia (DAVIES, 2003; ZARB *et al.*, 2002).

4.2. Histofisiologia do Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo cuja matriz extracelular é mineralizada, conferindo a este tecido propriedades ideais para a realização das funções de suporte e proteção do organismo vertebrado. A extrema rigidez do tecido ósseo é resultado da interação entre o componente orgânico e o componente mineral da matriz extracelular. Dentre os tecidos de suporte, o tecido ósseo é considerado como tendo o de maior grau de evolução, sendo o principal constituinte dos ossos, com alto grau de rigidez e resistência à pressão (DALLE CARBONNARE *et al.*, 2005).

O componente celular do tecido ósseo é constituído pelos osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células osteoprogenitoras. Os osteoblastos são responsáveis pela síntese dos constituintes orgânicos da matriz óssea e também concentram fósforo e cálcio, participando da mineralização da matriz (WATZEK, 2004; ZAFFE, 2005).

O componente orgânico da matriz, produzido pelos osteoblastos, é predominantemente constituído pela proteína colágeno tipo I (85%), com pequenas quantidades de colágenos tipo III e V (5%). As proteínas não colagênicas da matriz perfazem os 10% restantes (TZAPHLIDOU, 2005).

As proteínas não colágenas da matriz são importantes na mineralização, organização da matriz extracelular, controle das interações célula-célula, célula matriz e envio de sinais para as células ósseas (DAVIES, 2000; DE OLIVEIRA *et al.*, 2003; WATZEK, 2004). Osteopontina, sialoproteína óssea, osteonectina e osteocalcina são proteínas não colágenas fosforiladas, expressas *in vivo* e *in vitro* pelos osteoblastos antes do início da deposição mineral, constituindo marcadores da osteogênese (DE OLIVEIRA *et al.*, 2003; DE OLIVEIRA & NANCI, 2004).

A osteopontina (OPN) é expressa nos estágios iniciais da osteogênese, antes da diferenciação das células ósseas e após o início da mineralização. A sialoproteína óssea (BSP) é um marcador da diferenciação osteoblástica, enquanto a osteonectina e a osteocalcina são proteínas com alta afinidade pelos cristais de hidroxiapatita (DAVIES, 2000; YOUNG, 2003; DE OLIVEIRA E NANCI, 2004).

Além da porção orgânica, a matriz óssea é composta por uma porção inorgânica cuja composição é basicamente íons fosfato e cálcio formando cristais de hidroxiapatita (DALLE CARBONARE *et al.*, 2005; TZAPHLIDOU, 2005).

A mineralização da matriz óssea é regulada pelas proteínas da matriz e por enzimas, principalmente pela fosfatase alcalina (ROSA & BELOTI, 2003; XAVIER *et al.*, 2003; DECLERCQ *et al.*, 2005). Em cultura de células osteogênicas, aumento na atividade e expressão de fosfatase alcalina (ALP) marca o início da mineralização e a diferenciação das células osteogênicas em fenótipo de osteoblasto (DECLERCQ *et al.*, 2005; DAVIES, 2003; BELOTI & ROSA, 2005).

Os osteócitos são osteoblastos que ficaram aprisionados em lacunas na matriz óssea, durante a sua formação. Os osteócitos comunicam-se com os osteoblastos e entre si, por meio de prolongamentos citoplasmáticos. Das lacunas, ocupadas pelo corpo celular do osteócito, partem canaliculos que contêm prolongamentos celulares que se dirigem para outras lacunas. Essa rede de canaliculos permite a difusão de nutrientes e a comunicação entre os osteócitos e osteoblastos (GRETZER *et al.*, 2002; WATZEK, 2004).

Os osteoclastos, participam dos processos de reabsorção e remodelação do tecido ósseo, sendo células multinucleadas derivadas da fusão de monócitos, que atravessam os capilares sangüíneos. Estas células gigantes são especializadas em decompor matriz mineralizada de tecido ósseo, dentina, esmalte e cartilagem calcificada (WATZEK, 2004).

A estrutura do tecido ósseo é mantida por uma relação delicada entre osteoblastos, responsáveis pela formação da matriz óssea, e osteoclastos, responsáveis pela reabsorção desta matriz (OREFFO, BORD & TRIFFITT, 1998). Os mecanismos reguladores são complexos e envolvem interações entre as células ósseas e diversos fatores locais e sistêmicos. Diversas citocinas estão envolvidas nesses mecanismos reguladores da remodelação óssea (DAVIES, 2000; BACHEL & KOHAL, 2005; MARCO *et al.*, 2005).

4.3. Reparo Ósseo

O tecido ósseo apresenta um processo combinado e constante de formação e reabsorção, denominado de remodelação óssea ou “turn over” ósseo. Esta remodelação é determinada pela carga genética e se mostra dependente de regulação e influências endócrinas, bioquímicas e ambientais. Mesmo no adulto, o tecido ósseo é metabolicamente ativo e a manutenção da matriz é o resultado de um balanço de atividade de síntese e

reabsorção, os quais refletem as atividades antagonistas de osteoblastos e osteoclastos (DAVIES, 2000; MARCO *et al.*, 2005).

A resposta de um tecido vivo que sofreu agressão e que foi perdido ou tratado cirurgicamente é denominada reparação. A reparação pode ocorrer por regeneração ou por cicatrização (DAVIES, 2000). Regeneração é a reprodução ou reconstituição de uma parte danificada ou perdida resultando em estruturas com a mesma arquitetura e função das estruturas originais. A cicatrização é a reparação de uma ferida por um tecido que não restaura completamente a arquitetura ou a função da parte danificada.

O tecido ósseo exibe um alto potencial de regeneração, sendo o único tecido não embrionário dos mamíferos que após sofrer agressão restabelece completamente suas características, não formando cicatrizes (DAVIES, 2000).

Os principais mecanismos relacionados ao processo de osseointegração dos implantes são similares aos que ocorrem durante o reparo de uma fratura óssea, e envolvem uma cascata de eventos celulares e moleculares (DAVIES, 2003; MARCO *et al.*, 2005). A resposta inicial do tecido ósseo após a instalação do implante é caracterizada por reação inflamatória que se desenvolve devido ao trauma cirúrgico local e a presença do implante (DAVIES, 2000; DAVIES, 2003).

No procedimento cirúrgico para instalação dos implantes ocorre lesão do tecido ósseo rompimento de vasos sanguíneos e conseqüente sangramento (HUNT, 1990; DAVIES, 2003; FRANCHI, 2005). O sangue entra em contato com a superfície do implante, que será recoberta por uma camada de proteínas plasmáticas que irão mediar a resposta celular subsequente, uma vez que as células interagem com as proteínas e não com a superfície o implante diretamente (PUELO & NANJI, 1999; DAVIES, 2000; SELA *et al.*, 2003). Em poucos minutos o sangue extravasado sofre coagulação, ocorrendo ativação plaquetária, liberação de fatores de crescimento como PDGF e TGF β , fatores vasoativos e formação da rede de fibrina, por meio da qual as células inflamatórias migrarão (MARCO *et al.*, 2005).

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

Os macrófagos são células que secretam uma miríade de moléculas, entre elas, citocinas e quimiocinas que podem atuar no recrutamento de células osteoprogenitoras

induzindo a neoformação óssea ou reabsorção óssea (CHAMPAGNE *et al.*, 2002; SOSKOLNE *et al.*, 2002; DAVIES, 2003; REFAI *et al.*, 2004). As citocinas produzidas pelos macrófagos podem ter efeitos sobre diferentes tipos celulares ou vários efeitos diferentes sobre o mesmo tipo celular, podendo inclusive produzir efeitos antagônicos simultaneamente (YAMADA *et al.*, 2000; SOSKOLNE *et al.*, 2002). Os efeitos produzidos pelas citocinas dependem de sua interação com os receptores de superfície presentes na célula alvo (YAMADA *et al.*, 2000; REYES-BOTTELA *et al.*, 2002; FRANCHIMONT, WERTZ & MALAISE, 2005).

Células da linhagem osteogênica ou mesmo células mesenquimais, quando estimuladas por citocinas e fatores de crescimento liberados pelos macrófagos e plaquetas, migram para a região peri-implantar, ligam-se à camada de glicoproteínas plasmáticas, adsorvidas à superfície do implante, diferenciam-se em osteoblastos e iniciam a deposição de matriz óssea (REFAI *et al.*, 2004; MARCO *et al.*, 2005). Este processo, conhecido como osteogênese de contato, ocorre a partir da superfície do implante em direção à superfície óssea peri-implantar. Entretanto, este não é o único processo responsável pela formação óssea ao redor dos implantes. Na osteogênese à distância, o tecido ósseo é formado a partir de células osteogênicas presentes no tecido ósseo peri-implantar, resultando na formação óssea em direção ao implante (PUELO & NANCI, 1999; DAVIES, 2003; MARCO *et al.*, 2005).

Independentemente do processo pelo qual o tecido ósseo é formado, o mesmo envolve a diferenciação das células osteogênicas. Existem evidências de que fatores de crescimento e citocinas exerçam funções diferentes sobre as células osteogênicas de acordo com seu estágio de diferenciação (OREFFO, BORD & TRIFFITT, 1998; YAMADA *et al.*, 2000; BAKSH *et al.*, 2003; HENG *et al.*, 2004; HUGHES *et al.*, 2006). Assim, a cicatrização peri-implantar pode ser diferente em áreas onde existe grande quantidade de medula óssea e células indiferenciadas, em relação à áreas com maior quantidade de células da linhagem osteogênica (DAVIES, 2000; REYES-BOTTELA *et al.*, 2002).

A idade e a origem das células osteogênicas parece ter relação com a resposta intracelular desencadeada pelas citocinas e fatores de crescimento (OREFFO, BORD & TRIFFITT, 1998; REYES-BOTTELA *et al.*, 2002). Em indivíduos idosos, ocorre redução da capacidade proliferativa dos osteoblastos e da resposta a estímulos biológicos (OREFFO, BORD & TRIFFITT, 1998).

Os osteoblastos também produzem citocinas após o contato com diferentes materiais de implante (HOWORITZ & GONZALES, 1996; BOYAN *et al.*, 2003; RICE *et al.*, 2003;

ZINGER *et al.*, 2004) e podem ser estimulados pelos macrófagos (DAVIES, 2000). A seqüência temporal em que cada citocina é expressa pelos osteoblastos, assim como a seqüência em que são expressos os receptores para essas citocinas é importante para o conhecimento do mecanismo por meio do qual essas moléculas controlam e regulam a diferenciação e função das células ósseas (PUELO & NANCI, 1999; REYES-BOTTELA *et al.*, 2002; DAVIES, 2003; HENG *et al.*, 2004).

Variações na topografia do implante influenciam a adesão dos macrófagos e osteoblastos e podem influenciar a produção e a concentração dos fatores de crescimento no sítio peri-implantar, agindo como um bioreator (SCHWARTZ & BOYAN, 1994). Após o contato com diferentes superfícies, os osteoblastos podem produzir TGF β (BOYAN *et al.*, 2003; BACHLE & KOHAL, 2004; ZINGER *et al.*, 2005), IL1 (SPYROU *et al.*, 2002; RICE *et al.*, 2003; CURRAN, GALLAGHER & HUNT, 2005; VALLÉS *et al.*, 2008), IL6 (SCHMIDT *et al.*, 2003; CURRAN, GALLAGHER & HUNT, 2005; FRANCHIMONT *et al.*, 2005) e a liberação desses fatores é influenciada pelas características topográficas do titânio (SPYROU *et al.*, 2002; BACHEL & KOHAL, 2004). A síntese de colágeno, de matriz extracelular, de citocinas e de fatores de crescimento é favorecida pela rugosidade superficial do implante (ROSA & BELOTI, 2003).

Osteoblastos e células osteoprogenitoras respondem à variações na composição do microambiente (citocinas e fatores de crescimento) e a mudanças na microtextura dos implantes, o que pode ser usado pela bioengenharia para favorecer a osseointegração (DAVIES, 2000; DAVIES, 2003). Os eventos moleculares envolvidos na diferenciação e resposta das células osteoblásticas são pouco esclarecidos. Assim, a localização e determinação dos níveis de citocinas em subgrupos de células da linhagem osteogênica pode contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e regulação da osteogênese (DAVIES, 2000).

4.4. Osteogênese *in vitro*

O estudo *in vitro* da osteogênese tem sido impulsionado por pesquisas utilizando biomateriais na ortopedia e na implantodontia, principalmente após o advento da osseointegração (DAVIES, 2003). Essas culturas podem ser feitas a partir de osteoblastos da calvária de roedores neonatos, de esplantes ósseos, células da medula óssea de humanos ou de

animais e também a partir de linhagens celulares imortalizadas (DAVIES, 2000; HENG *et al.*, 2004).

Em cultura primária, ao se obter células mesenquimais para osteogênese *in vitro*, somente algumas das células serão multipotenciais, enquanto a maioria das células será restrita, ou seja, preparada para diferenciação em determinado subtipo (BAKSH, DAVIES & ZANDSTRA, 2003). Acredita-se que células multipotenciais tornam-se restritas à uma única linhagem em função do meio de cultura, portanto, características particulares do meio de cultura podem agir a favor de um determinado caminho de diferenciação (ANDRADES *et al.*, 1998; HENG *et al.*, 2004).

Segundo Owen (1998), existem células bipotenciais para osteoblastos e adipócitos, que sob condições particulares (microambiente), diferenciar-se-ão em um desses subtipos. Parece existir também uma célula bipotencial para osso e cartilagem (ZARB *et al.*, 2001; WATZEK, 2004), apresentando marcadores comuns como sialoproteína óssea, osteopontina, osteonectina e osteocalcina (DAVIES, 2000). Portanto, em uma mesma cultura pode haver células monopotenciais e células multi ou bi potenciais, o que torna complexa a compreensão dos mecanismos moleculares que fazem com que a célula expresse um determinado fenótipo (ANDRADES *et al.*, 1998; DAVIES, 2000; YAMADA *et al.*, 2000).

Estimativas feitas por diluição indicam que células osteoprogenitoras estão presentes em baixa frequência em cultura proveniente de calvária (<1%) e medula de rato e camundongo (<1%) (AUBIN, 1999). Em calvária parecem existir duas populações de células osteoprogenitoras, uma população mais diferenciada, que sob condições apropriadas de cultura (ácido ascórbico, β -glicerofosfato e soro fetal) origina o fenótipo osteoblástico e outra população, aparentemente menos diferenciada, que necessita de adição de dexametasona e de outros fatores indutores específicos, como BMPs (DAVIES, 2000; BELOTI & ROSA, 2005).

Quando osteoblastos provenientes da calvária de rato são analisados no 21º dia de cultura, somente dois marcadores (ALP e PTH) são expressos simultaneamente por todos os osteoblastos, indicando a presença de células em diferentes estágios de diferenciação (DAVIES, 2000). Outros marcadores, incluindo osteopontina, BSP e osteocalcina são expressos diferencialmente nas subclasses de osteoblastos, dependendo do estágio de maturação do osso, da idade do osteoblasto, da origem da células (AKINTOYE *et al.*, 2006; 2008) e também do microambiente (CLAUSEN *et al.*, 2006; AKINTOYE *et al.*, 2006; 2008). Dessa forma, osteoblastos histologicamente idênticos, completamente diferenciados, são molecularmente heterogêneos (DAVIES, 2000; PERINPANAYAGAM *et al.*, 2006).

O parâmetro mais confiável para verificar a diferenciação final de osteoblastos é a formação de matriz extracelular mineralizada (Heidi *et al.*, 2005). No entanto, o padrão de mineralização é diferente em culturas primárias provenientes de diferentes sítios e de culturas imortalizadas. As conseqüências biológicas e fisiológicas dessas diferenças não são conhecidas, mas suportam a hipótese de que nem todos os osteoblastos maduros são funcionalmente idênticos, o que é sustentado pelo fato de haver diferenças na quantidade de proteínas não colágenas no osso trabecular e cortical de diferentes partes do esqueleto humano (DAVIES, 2000).

Ainda não está esclarecido se a diversidade de marcadores nos diferentes osteoblastos é reversível, se está ligada a sinais do microambiente, hormônios e ou fatores de crescimento (DAVIES, 2000; MARCO *et al.*, 2005). Essa heterogeneidade se entende à expressão de outras moléculas reguladoras como citocinas e seus receptores, e sugerem que os efeitos autócrinos e parácrinos são expressos de forma diferente pelas subclasses de osteoblastos e em tempos diferentes (BAKSH, DAVIES & ZANDSTRA, 2003).

Hormônios e citocinas regulam a atividade osteoblástica e sua diferenciação *in vitro*, mas existem discrepâncias e até mesmo efeitos opostos quando se compara células provenientes de medula óssea e células isoladas de outros ossos, embora algumas atividades e princípios sejam comuns (HENG *et al.*, 2004).

Há evidências crescentes de que algumas ações como crescimento e diferenciação dependem do estágio de diferenciação das células (WATZEK, 2004). Os mecanismos moleculares ligados a esses efeitos são pouco conhecidos, mas a localização e o nível de expressão de receptores e ligantes de citocinas em subgrupos específicos de células osteogênicas podem esclarecer os caminhos que conduzem ao desenvolvimento e regulação da osteogênese (DAVIES, 2000; YAMADA *et al.*, 2000).

4.5. Interações entre células mononucleares, osteoblastos e implantes

Os macrófagos são essenciais nas fases iniciais do reparo por promoverem o debridamento da ferida e por secretarem fatores de crescimento. Muitos desses fatores são citocinas que regulam o recrutamento e a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas e a síntese de proteínas da matriz extracelular (CHAMPAGNE *et al.*, 2002; REFAI *et al.*, 2004).

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

dos macrófagos no processo de formação óssea ao redor dos implantes (REFAI *et al.*, 2004; MARCO *et al.*, 2005). Contudo, o papel dos macrófagos na performance e longevidade dos implantes ainda não foi completamente esclarecido. O macrófago é uma das primeiras células a alcançar a interface tecido-implante e sua interação com o material implantado envolve adesão, ativação e secreção de citocinas e quimiocinas no sítio do implante (SOSKOLNE *et al.*, 2002; WATZEK, 2004). As citocinas e quimiocinas estão envolvidas tanto nas fases destrutivas como reparativas dos estágios iniciais da cicatrização após a instalação dos implantes (SOSKOLNE *et al.*, 2002; REFAI *et al.*, 2004).

Os macrófagos ativados secretam citocinas pró-inflamatórias como $TNF\alpha$, IL1, IL6 e sua ativação pode ocorrer devido ao contato com partículas de debris ou outros estímulos como a presença de lipopolissacarídeos bacterianos na superfície do implante (HOWORITZ & GONZALES, 1996; WANG *et al.*, 1996; TSUTSUI *et al.*, 1999). Segundo Gretzer *et al.* (2003) essas citocinas podem ser identificadas e quantificadas pelo método Elisa, em culturas de macrófagos não ativadas. Embora o método Elisa seja o mais utilizado para quantificar citocinas produzidas pelos macrófagos, esse método apresenta limitações, pois não permite dosar quantidades pequenas, sendo muitas vezes necessário estimular os macrófagos com lipopolissacarídeos (KISHIDA *et al.*, 1996).

O $TNF\alpha$ é uma citocina pró-inflamatória com efeitos sobre vários tipos celulares, parece sinalizar na fibrinogênese e angiogênese, estimula a atividade osteoclástica e regula a proliferação dos osteoblastos, sendo importante na osseointegração (GRETZER *et al.*, 2003; REFAI *et al.*, 2004). O $TNF\alpha$ é um dos inibidores mais ativos da diferenciação e proliferação dos osteoblastos (TSUTSUI *et al.*, 1999; REFAI *et al.*, 2004; WATZEK, 2004), atuando também como potente estimulador da reabsorção óssea por meio de seu efeito inibitório sobre osteoblastos e sua capacidade de estimular osteoclastos, efeito similar à IL1 (CURRAN, GALLAGHER & HUNT, 2005).

A IL1, IL6 e IL17 estimulam a formação de osteoclastos e sua capacidade de reabsorção, conseqüentemente estão envolvidas na remodelação óssea (REFAI *et al.*, 2004; SHEN *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2009; GABAY & MCLNNES, 2009). A IL17 tem sido considerada fator chave no desenvolvimento da osteoartrite e no conseqüente desencadeamento da reabsorção da matriz óssea e cartilaginosa pelos clastos. No entanto, estudos recentes tem apontado um papel regulador desta citocina (PINKERTON *et al.*, 2008).

A PGE_2 , assim como a $TNF\alpha$ e a IL1, é um mediador envolvido na reabsorção, mas parece exibir também um caminho alternativo para neoformação óssea (SOSKOLNE *et al.*, 2002). A PGE_2 tem efeito dose dependente, estimulando osteoblastos quando em baixas

concentrações, ao passo que em concentrações maiores tem efeito negativo sobre osteoblastos e estimula osteoclastos (CURRAN, GALLAGHER & HUNT, 2005). Segundo Wang *et al* (1996), o titânio comercialmente puro estimula macrófagos peritoneais e células da linhagem macrofágica a liberar PGE₂ e IL1, principalmente quando os macrófagos são induzidos por partículas fagocitáveis.

Além de produzir compostos pró-inflamatórios, os macrófagos também são capazes de produzir citocinas anti-inflamatórias como a TGFβ (WANG *et al.*, 1996) e IL10 (GRETZER *et al.*, 2003), e sinais osteoindutores como a BMP2 e TGFβ, quando expostos a diferentes estímulos (CHAMPAGNE *et al.*, 2002; WATZEK, 2004).

As BMPs são expressas pelos osteoblastos e influenciam na diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas. Entretanto, existem evidências de que os macrófagos também expressam BMP e que podem constituir uma via alternativa na osteoindução (CHAMPAGNE *et al.*, 2002; GARCIA LOPEZ *et al.*, 2005).

A IL10 é uma molécula antiinflamatória produzida pelos macrófagos, linfócitos e osteoblastos, que inibe a síntese de IL1, IL8 e TNFα, limitando a extensão e duração da resposta imune (GRETZER *et al.*, 2003).

Estudos utilizando culturas de macrófagos, osteoblastos e células mesenquimais indiferenciadas provenientes da medula, permitiram ampliar o conhecimento sobre a função dos fatores de crescimento e citocinas na osteogênese. Atualmente, sabe-se que as características da superfície do implante afetam a adesão dos macrófagos e osteoblastos, bem como o padrão de secreção das citocinas inflamatórias (HOROWITZ & GONZALES, 1996; DAVIES, 2000; SOLSKONE *et al.*, 2002; REFAI *et al.*, 2004).

A exposição a diferentes biomateriais (RICE, HUNT & GALLAGHER, 2003; CIAPETTI *et al.*, 2005) e a diferentes rugosidades de superfície (RICE *et al.*, 2005) influencia a adesão e a liberação de citocinas em culturas de macrófagos e de osteoblastos. Superfícies rugosas são mais sujeitas à contaminação que superfícies lisas, o que resulta em níveis diferentes de secreção de TNFα e PGE₂ (SOLSKONE *et al.*, 2002).

O sobrenadante produzido em culturas de macrófagos induz a formação ou reabsorção óssea em cultura de osteoblastos, embora ainda não seja possível compreender completamente este mecanismo (TSUTSUI *et al.*, 1999). Os mediadores liberados pelos macrófagos agem sobre osteoblastos e vice-versa (HOROWITZ & GONZALEZ, 1996; TSUTSUI *et al.*, 1999; DAVIES, 2000), o que pode ser comprovado em estudos utilizando cocultura dessas células (HOROWITZ & GONZALEZ, 1996; CURRAN, GALLAGHER & HUNT, 2005). Em modelo utilizando cocultura de macrófagos e osteoblastos, Horowitz & Gonzalez (1996)

levantaram a hipótese de interação entre os mediadores produzidos por essas células. Segundo essa hipótese, o TNF α liberado pelos macrófagos faz com que os osteoblastos liberem PGE $_2$, e esta diminui a liberação de TNF α pelos macrófagos. Assim, mais estudos que avaliam a interação entre macrófagos, osteoblastos e implantes são necessários para entendimento da osseointegração e da resposta do tecido ósseo aos biomateriais.

4.6. Influência da superfície dos implantes no reparo ósseo

O titânio comercialmente puro tem sido utilizado nos implantes dentais e ortopédicos devido às suas excelentes propriedades físicas e a biocompatibilidade (XIE *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2009).

A busca constante por condições que favoreçam a neoformação óssea ao redor dos implantes tem estimulado as indústrias a desenvolverem diferentes tratamentos de superfície para os implantes de titânio (BACHLE & KOHAL, 2004). O tipo de tratamento de superfície influencia a adesão, diferenciação e morfologia celular na interface do implante (BRUNETTE & CHEROUDI, 1999; DE OLIVEIRA & NANCI, 2004; ROSA & BELLOTI, 2003; XAVIER *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2004), embora em alguns tipos de tratamento, esses efeitos sejam negativos, como nos tratamentos por adição (AMARANTE & LIMA, 2001).

Nos implantes tratados por adição, são incorporadas substâncias ou partículas, com o objetivo de favorecer a diferenciação de osteoblastos e a produção de matriz, acelerando a velocidade e a qualidade da neoformação óssea (COELHO *et al.*, 2009). No entanto, alguns estudos observaram que as partículas incorporadas por adição soltam-se da superfície do titânio, são fagocitadas por macrófagos e estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, retardando o processo de reparo (AMARANTE & LIMA, 2001; COELHO *et al.*, 2009).

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

LEMONS, 2008), estimulando eventos pró-inflamatórios e gerando instabilidade do implante (LEMONS, 2004). Várias técnicas têm sido usadas em escala comercial para incorporação de Ca e P, entre elas deposição sol-gel, a laser, jateamento e deposição por feixes iônicos (COELHO *et al.*, 2009 A). As superfícies geradas por algumas dessas técnicas, em escala nanométrica tem se mostrado as mais estáveis, com menor taxa de dissolução (MENDES, MOINEDDIN & DAVIES, 2008; COELHO *et al.*, 2009 A, B; CARDARAPOLI & SUZUKI, 2009). Estudos *in vitro* utilizando cultura de células, constituem uma ferramenta útil na investigação dessas superfícies por permitirem uma análise detalhada das interações célula, matriz e superfície do implante (LINCKS *et al.*, 1998; BOYAN *et al.*, 2003; BACHLE & KOHAL, 2004).

Variações na porosidade e rugosidade superficial do titânio influenciam o metabolismo celular e a liberação de citocinas e fatores de crescimento, tanto em cultura de macrófagos (SPYROU *et al.*, 2002), como de osteoblastos (BOYAN *et al.*, 2003; RICE *et al.*, 2005). Não está esclarecido se a rugosidade de superfície é responsável pelas alterações celulares, ou se a adesão de macromoléculas do soro a essas superfícies tratadas, modula o comportamento celular (BACHEL & KOHAL, 2004).

A expressão do fenótipo osteoblástico é sensível à topografia da superfície do implante (ZINGER *et al.*, 2003). Em geral, as células cultivadas sobre superfícies rugosas apresentam características morfológicas de osteoblastos em um estado mais diferenciado e secretam maior quantidade de fosfatase alcalina (DE OLIVEIRA & NANCI, 2004). Os osteoblastos interagem com o substrato por meio de receptores de integrinas e o tipo de substrato determina qual integrina e proteína da matriz será expressa (YAO *et al.*, 2005; SELA *et al.*, 2007). A deposição de proteínas da matriz relacionadas à diferenciação de osteoblastos e à remodelação óssea, como osteocalcina e sialoproteína, são afetadas pelas características químicas e o tipo de tratamento de superfície realizado (PUELO & NANCI, 1999; BACHEL & KOHAL, 2004; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; ROSA *et al.*, 2009).

Embora vários estudos tenham investigado os efeitos da topografia e tratamento de superfície dos implantes no reparo ósseo, ainda permanecem dúvidas sobre o comportamento dessas superfícies no microambiente biológico. Para compreensão do mecanismo de formação óssea ao redor dos biomateriais é necessário a interação de conhecimentos quanto à superfície do material, perfil de citocinas e fatores de crescimento liberados pelas células nessas condições (BACHEL & KOHAL, 2004; MARCO *et al.*, 2005).

5. Objetivos

5.1. Objetivo geral

Avaliar a influência da topografia e composição química da superfície do titânio na osteogênese *in vitro*.

5.2. Objetivos específicos

- 5.2.1 Avaliar a viabilidade e a adesão das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células osteogênicas cultivadas sobre superfícies de titânio obtidas por jateamento/subtração ou nano-recobrimento de Cálcio e Fósforo (Ca e P).
- 5.2.2 Avaliar a morfologia das células mononucleares do sangue periférico, células osteogênicas e cocultura (PBMC e células osteogênicas) cultivadas sobre as superfícies de titânio.
- 5.2.3 Avaliar o efeito das diferentes superfícies na produção de osteopontina e fosfatase alcalina em células osteogênicas e na cocultura (PBMC e células osteogênicas), por meio de imunolocalização.
- 5.2.4 Determinar os níveis das citocinas IL1 β , TGF β 1, IL10 e IL17 produzidas por células mononucleares do sangue periférico, células osteogênicas e cocultura (PBMC e células osteogênicas) cultivadas sobre as diferentes superfícies de titânio.

6. Material e métodos

6.1. Obtenção e caracterização dos discos de titânio

Os discos de titânio utilizados nesta pesquisa foram produzidos, embalados e gentilmente doados pela empresa Bicon (Boston, USA). Estes foram construídos em liga de titânio-alumínio-vanádio (Ti-6AL-4V), com 12 mm de diâmetro e 4mm de altura, os quais receberam três tipos de tratamentos de superfície denominados de S1, S2 e S3. Os discos S1 foram obtidos a partir da usinagem do titânio, sendo comercialmente conhecidos como superfícies usinadas ou lisas. Estes não receberam tratamento adicional que possibilitasse a modificação da textura ou composição química da liga. Os discos S2 e S3 tiveram suas superfícies modificadas em relação aos discos S1 (controle de heterogeneidade). As superfícies S2 foram obtidas pela associação de duas técnicas: jateamento com partículas de alumina, seguidas por ataque ácido, o que resultou em superfícies com rugosidade superficial em torno de 0,66 μ m. A superfície S3 recebeu o mesmo tratamento que a S2, o qual foi seguido por deposição iônica de partículas de Ca e P em escala nanométrica (300-500 nm), resultando em superfícies bioativas com o mesmo padrão de rugosidade que a superfície S2. As três superfícies encontram-se disponíveis comercialmente e foram previamente caracterizadas por Coelho & Lemons (2008).

6.2. Obtenção das células humanas

Para obtenção de células humanas do sangue periférico e células osteogênicas, foram selecionados pacientes adultos saudáveis (35-45 anos), triados no curso de especialização em Implantodontia da Universidade Federal de Uberlândia para a realização de enxerto ósseo prévio à instalação dos implantes. Foram utilizados como critério de exclusão: uso de corticosteróides, diabetes e outros distúrbios endócrinos como hipo ou hipertireoidismo. A realização da coleta das amostras teve a autorização do Comitê de Ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Uberlândia (protocolo 046/06).

6.3. Obtenção das células osteogênicas

As células osteogênicas, compostas por uma população mista em diversos estágios de diferenciação, foram obtidas a partir da digestão enzimática de fragmentos ósseos removidos

durante a cirurgia para obtenção de enxerto. A região mentoniana foi escolhida como área doadora para os enxertos, os quais foram removidos em forma circular com o auxílio de broca trefina cirúrgica de 8 mm de diâmetro, sob irrigação constante e abundante com soro fisiológico. A maior parte dos fragmentos foi usada nos próprios pacientes para a reconstrução óssea, e somente ossos remanescentes dos ajustes realizados para adaptação dos blocos foi utilizada no experimento. Esses fragmentos ósseos foram transferidos para tubo cônico contendo “meio de lavagem”, constituído de DMEM (Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado com 50 µg/ml de gentamicina (Gibco) e 2.4 µg/ml de fungizona (Gibco).

6.4. Cultura primária de células osteogênicas

As amostras de osso de cada paciente foram abundantemente lavadas com solução salina balanceada de Hanks (HBSS), colocadas em placa de petri estéril, trituradas com o auxílio de espátula nº7 e, em seguida transferidas para novo tubo contendo 5ml de solução de colagenase tipo II (1mg/ml; Sigma, St. Louis, MO). As amostras foram digeridas em 4 ciclos de 30 minutos a 37°C com troca de colagenase a cada ciclo. O sobrenadante de cada digestão enzimática foi coletado e transferido para tubo contendo meio indutor de diferenciação (MID), constituído de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, São Paulo, Brasil), 50 µg/ml de gentamicina (Gibco), 0.3 µg/ml de fungizona (Gibco), 10⁻⁷ M de dexametasona (Sigma-Aldrich), 5 µg/ml de ácido L-ascorbico (Gibco), 7 mM de glicerofosfato de sódio (Fluka Chemical Co., Buchs, Suíça). Ao final da última digestão enzimática, os sobrenadantes foram filtrados em filtro de nylon de 70-µm (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), transferidos para novo tubo e lavados quatro vezes por 5 minutos a 800 g. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspendido em MID 10%, transferido para as garrafas de cultura de 25 cm² (1.3x10⁴ células/cm²) e mantidos em câmara de CO₂ a 37°C. O meio foi trocado a cada 2-3 dias e as células cultivadas por aproximadamente 4 semanas. Após atingirem confluência, as células foram tripsinizadas com solução de tripsina e EDTA (0.25%) por 10 minutos a 37°C, delicadamente raspadas com “cell scraper” e coletadas em DMEM completo [(DMEM (Gibco) suplementado com 10% SFB (Cultilab), 50 µg/ml de gentamicina (Gibco), 0.3 µg/ml de fungizona (Gibco)] para inativação da enzima.

6.5. Cultura das células osteogênicas sobre a superfície do titânio

As células osteogênicas, obtidas como previamente descrito, foram centrifugadas por 5 minutos a 800xg, contadas em hemocitômetro, distribuídas em placas de 24 poços contendo os discos S1 (Grupo S1), S2 (Grupo S2) e S3 (Grupo S3) na densidade de 5×10^4 células/superfície e completadas com 1,5 ml de meio DMEM completo. A cada 3 dias, 500 μ l de meio eram removidos e adicionado meio novo. Durante os 14 dias de cultura não foram adicionados agentes indutores de diferenciação. Antes do plaqueamento, os discos foram pré-condicionados com plasma sanguíneo humano autólogo. Em 24 horas, 7 e 14 dias, os sobrenadantes foram coletados para dosagem das citocinas IL1 β , TGF β 1, IL10 e IL17.

6.6. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Foram colhidos 30ml de sangue periférico de cada paciente, em tubos heparinizados (10 a 15 u/ml). Para obtenção das células mononucleares o sangue foi diluído em HBSS, distribuído em tubos contendo Histopaque 1077 na densidade 1076 (Sigma Chemical Co.) e centrifugado a 200xg por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o plasma colhido foi utilizado para condicionamento dos discos e a nuvem celular contendo os PBMC foi coletada e centrifugada a 1000xg por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o sedimento celular ressuspenso em 3 ml de DMEM completo e a viabilidade celular determinada por contagem em câmara hemocitométrica.

6.7. Cultura primária de células mononucleares do sangue periférico

Após a determinação da viabilidade, a suspensão celular foi distribuída sobre os discos de titânio (Grupos S1, S2 e S3) inseridos em placas de poliestireno de 24 poços, na concentração de 5×10^4 células/superfície e incubadas por 4 horas em estufa umidificada a 37°C, contendo ar a 5% de CO₂. Após esse período as placas foram centrifugadas a 200 g por 10 minutos e o sobrenadante aspirado para remoção das células não aderentes. Em seguida, cada poço recebeu DMEM completo e as células foram cultivadas a 37°C por 24 horas em câmara de CO₂ umidificada. Decorrido este período, os sobrenadantes foram colhidos e armazenados a -70°C até utilização.

6.8. Cocultura de mononucleares e células osteogênicas

A cocultura das células mononucleares e osteogênicas foi realizada nas superfícies S1, S2 e S3, inseridas em placas de 24 poços na proporção de 1:1 (mononucleares/osteogênicas), na concentração final de 5×10^4 células em DMEM completo (CURRAN *et al.*, 2005). A cocultura foi mantida por 24 horas, 7 e 14 dias, com troca de 500 μ l de meio a cada 3 dias. Em todos os períodos experimentais o sobrenadante foi colhido para dosagem das citocinas IL1 β , TGF β 1, IL10 e IL17.

6.9. Análise da viabilidade celular

As culturas de PBMC no período de 24 horas e de células osteogênicas, nos períodos de 24 horas e 7 dias, foram submetidas ao teste de viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT-Formazan. De cada poço, foram removidos 1000 μ l de meio, adicionados 50 μ l de substrato MTT na concentração de 5mg/ml e incubado a 37°C por 4 horas. Em seguida, cada poço recebeu 500 μ l de SDS e após 60 minutos, 100 μ l de cada poço foi transferido para placas de 96 poços e a viabilidade determinada em leitor de microplacas a 570 nm.

6.10. Análise da morfologia celular ao Microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Foi realizada análise morfológica descritiva das células do PBMC e da cocultura em 24 horas e das células osteogênicas no período de 24 horas e 7 dias. O sobrenadante foi removido, os discos foram lavados em salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7.2) e fixados em Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2%, tamponados com cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4) por 1 hora. Após esse período, o fixador foi removido, os discos desidratados em concentrações crescentes de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%) e transferidos para o álcool absoluto. Após a desidratação, os discos foram secos até o ponto crítico de -40°C (Polaron, UK), receberam 3 ciclos de cobertura de ouro-paládio no metalizador (Emitech, ISI, Kent, England) e foram analisados ao MEV (Hitachi 3500N, USA). As amostras foram analisadas em triplicata, em várias magnificações, utilizando exposição de 5 a 15 kV.

6.11. Reação de imunofluorescência para Osteopontina

Para avaliar a presença de osteopontina na cultura de células osteogênicas e na cocultura, foi utilizado o método de imunofluorescência indireta. As superfícies S1, S2 e S3 contendo as culturas de células de 24 horas, foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2, por 10 minutos à temperatura ambiente, lavadas em tampão tris-borato (TBS) pH 7,4, permeabilizadas com solução de Triton X-100 a 0,5% em TBS por 10 minutos e cuidadosamente lavados em TBS-Tween 20 a 0,05 % (TBS-T). O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com soro albumina bovina (BSA) a 1% em TBS por 20 minutos. Em seguida as células foram lavadas em TBS-T e incubados com o anticorpo monoclonal IgG1 anti-OPN produzido em camundongo, clone MPIIB10 (Hybridoma Bank, Iowa, EUA) na diluição de 1:800 em TBS-T contendo 0,9% de BSA (TBS-T-BSA) e incubados por 60 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas com TBS-T e incubadas por 50 minutos com anticorpo policlonal de cabra anti-IG1 de camundongo marcado com Alexa Fluor 594 (Molecular Probes,EUA) e Faloidina ligada a Alexa Fluor 488 (Molecular Probes,EUA) na diluição de 1:200 em TBST-BSA. Após esse período as células foram novamente lavadas, incubadas com Hoechst 2240 (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:1000 por 5 minutos para visualização nuclear e montadas com meio de montagem anti-fade (Prolong, Molecular Probes). Como controle negativo as amostras foram incubadas em TBS-T por 60 minutos, seguido da incubação com anticorpo policlonal anti-IG1 de camundongo marcado com Alexa Fluor 594 (Molecular Probes,EUA) por 50 minutos.

6.12. Reação de imunofluorescência para Fosfatase Alcalina (ALP)

Para avaliação da presença de fosfatase alcalina nas células osteogênicas e na cocultura, foi utilizado o método de imunofluorescência indireta nos períodos de 7 e 14 dias. Para tanto as células foram fixadas em paraformaldeído, permeabilizadas e os sítios inespecíficos bloqueados por 20 minutos. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo monoclonal IgG1 anti-ALP humana produzida em camundongo, clone B4:78 (Hibridoma bank, Iowa, EUA) na diluição de 1:100. Após esse período, as células foram lavadas e incubadas por 60 minutos com anticorpo policlonal anti-IG1 de camundongo marcado com Alexa Fluor 594 (Molecular Probes,EUA) e Faloidina ligada a Alexa Fluor 488 (Molecular Probes,EUA) na diluição de 1:200 em TBST-BSA. Os núcleos foram marcados

com Hoechst 2240 (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:1000 e montados em meio anti-fade (Prolong, Molecular Probes).

6.13. Análise quantitativa das imunomarcações

Para quantificar a porcentagem de células com marcação intracelular para OPN e ALP, imagens obtidas de cada superfície foram capturadas em microscópio de Epifluorescência. Cinco campos foram selecionados em cada superfície, sendo dois em cada extremidade e um central, baseados na programação da platina motorizada, em aumento de 200X. Em cada superfície analisada as imagens foram capturadas nas mesmas posições. A análise das imagens foi realizada utilizando software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), no qual foi realizada a contagem de núcleos, determinando o número de células aderidas por campo. A porcentagem de células marcadas para ALP ou OPN intracelular foi determinada em função do número de células marcadas com Faloidina e Hoechst.

6.14. Dosagem das citocinas

Os sobrenadantes, provenientes das culturas de células sobre as superfícies S1, S2 e S3 foram coletados nos períodos de 1,7 e 14 dias, aliqüotados e armazenados à -70°C negativos para determinação dos níveis da citocinas (IL1 β , TGF β 1, IL10 e IL17) pelo método Elisa Sanduíche. Para tanto, foi utilizado o kit-comercial e-Bioscience (San Diego, CA, EUA), conforme recomendação do fabricante. Brevemente, microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com 50 μ l de anticorpo de captura para cada citocina e incubadas por 18 horas a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas com solução de PBS-T a 0,5 % e bloqueadas com 100 μ l de solução de bloqueio por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas, e incubadas por 18 horas a 4°C, contendo as amostras testes, bem como as citocinas padrões. As placas foram lavadas e adicionado 50 μ l de uma mistura do anticorpo de detecção conjugado à biotina e avidina-peroxidase. Após 90 minutos a 37°C, as placas foram novamente lavadas e adicionado substrato enzimático (terametilbenzidina e 0,03% de H₂O₂ - TMB), incubado por 15 minutos. A reação foi interrompida com H₃PO₄ a 1M e a leitura efetuada a 450 nm em leitor de microplacas. A concentração de cada citocina foi determinada de acordo com a curva de regressão linear obtida pelas respectivas citocinas

padrões. A sensibilidade de detecção de cada citocina foi: IL1 β , 4 pg/ml; IL10, 2 pg/ml; TGF β 1, 60 pg/ml; IL17, 4 pg/ml.

6.15. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., CA, EUA). Foi aplicado teste de normalidade aos dados obtidos, e em seguida o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para análises múltiplas ($p < 0,05$). Nas amostras com diferença estatística significativa, foi aplicado o pós-teste Dunns ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média ($\mu \pm EP$).

7. Resultados

7.1. Viabilidade e adesão celular

A influência das superfícies na viabilidade celular foi avaliada usando um ensaio colorimétrico baseado na atividade das desidrogenases – MTT, e expressa como níveis de absorvância. Em 24 horas, não foram detectadas diferenças significativas nos níveis de absorvância das células osteogênicas ($p > 0.11$, Figura 1A) e das mononucleares ($p > 0,05$, Figura 1B) cultivadas sobre as três superfícies. Em 7 dias também não foram encontradas diferenças na viabilidade das células osteogênicas cultivadas sobre as superfícies usinadas (S1) e tratadas (S2 e S3) ($p > 0.13$, Figura 1A). Quando avaliados os níveis de absorvância das células osteogênicas ao longo do tempo, foi observado aumento entre os dias 1 e 7, para todas as superfícies analisadas. Entretanto, esta diferença foi estatisticamente significativa apenas no grupo de células osteogênicas cultivado sobre a superfície com nanorecobrimento de Ca e P (S3, $p < 0.001$, Figura 1A).

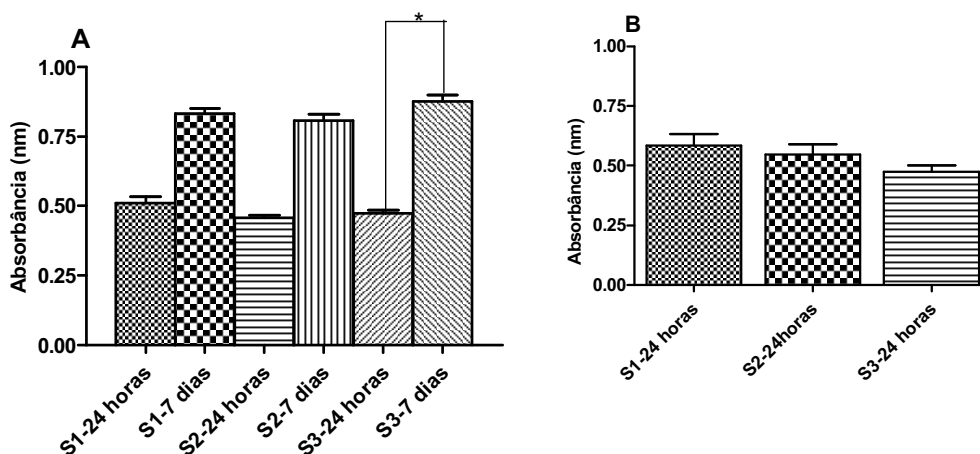


Figura 1: Níveis de absorvância das células osteogênicas (A) e mononucleares (B), cultivadas nas diferentes superfícies (S1, S2 e S3) em 24 horas e 7 dias (* $p < 0,05$). Resultados expressos em $\mu \pm EP$.

O número de células aderidas em cada período foi obtido por meio da contagem semi-automática dos núcleos marcados com Hoechst 33224. Em 24 horas (dia 1), não foram observadas diferenças estatísticas significantes na taxa de adesão celular dos mononucleares cultivados sobre as três superfícies avaliadas ($p > 0,05$). No entanto, a

adesão das células osteogênicas nos dias 1 e 7, variou em função da superfície ($p < 0.005$, Figuras 2A e 2B). No dia 1, a adesão celular foi significativamente maior nas superfícies tratadas (S2 e S3) quando comparada à superfície controle-S1 ($p < 0,001$; Figura 2A), sem diferenças estatísticas significantes entre as superfícies S2 e S3. Aos 7 dias, o número de células aderidas na superfície S1 foi significativamente maior que na superfície S3 ($p < 0,05$; Figura 2B) e a superfície S2 apresentou valores intermediários (Figura 2B). Em todas as superfícies, o número de células aderidas foi significativamente maior aos 7 dias quando comparado ao dia 1 ($p < 0,01$).

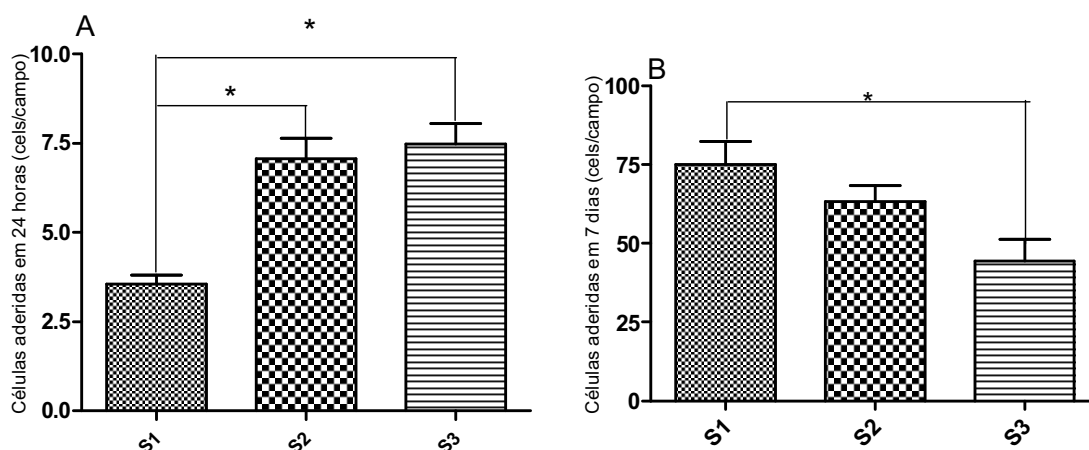


Figura 2: Adesão das células osteogênicas nas diferentes superfícies (S1, S2 e S3) em 24 horas (A) e 7 dias (B) (* $p < 0,05$). Resultados expressos em $\mu \pm EP$.

7.2. Análise morfológica ao Microscópio Eletrônico de Varredura

Imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas para avaliação morfológica qualitativa das células osteogênicas (Figura 3) e mononucleares aderidas sobre as três superfícies de titânio (Figura 4). A análise das células osteogênicas no período de 24 horas não demonstrou influência da superfície em sua morfologia (Figura 3). As mesmas apresentaram-se esféricas ou ligeiramente estreladas exibindo longos prolongamentos citoplasmáticos e mini-filopodias (Figura 3 A-C). Aos 7 dias, as células osteogênicas apresentaram-se espalhadas sobre as três superfícies, formando uma camada contínua (Figura 3D-F).

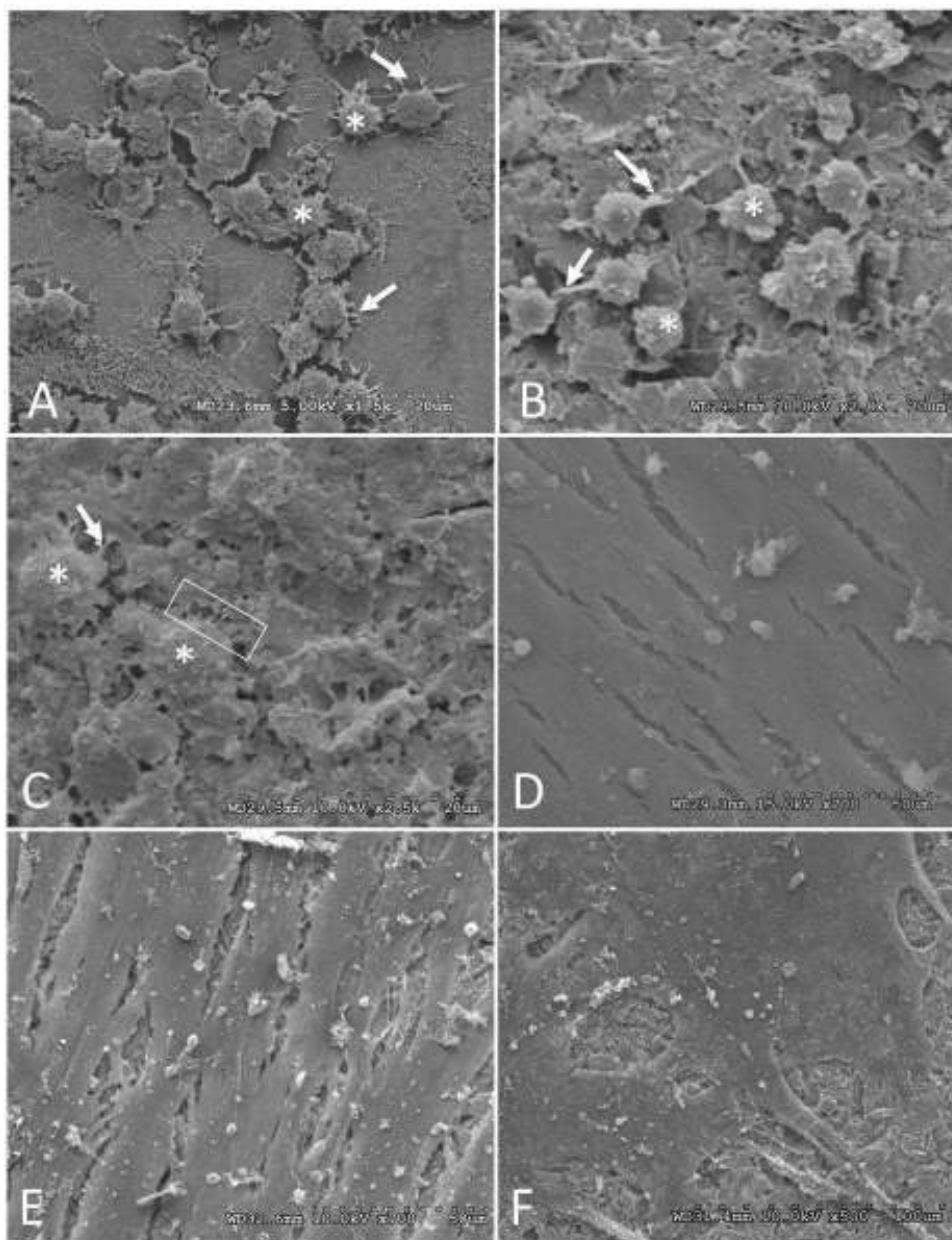


Figura 3: Células osteogênicas em 24 horas (A, B, C) e 7 dias (D, E, F), cultivadas sobre as superfícies S1 (A, D), S2 (B, E) e S3 (C, F), respectivamente. (*) indicam células esféricas e (➔) indicam prolongamentos citoplasmáticos. Ampliação escrita em cada foto.

Em 24 horas a população de mononucleares aderidas sobre a superfície apresentou grande heterogeneidade em relação à morfologia, sobretudo no grupo S1, onde foram observadas células com numerosas extensões citoplasmáticas associadas a alguns ninhos de células redondas e menores (Figura 4A). As células dos grupos S2 (Figura 4B) e S3 (Figura 4C) apresentaram-se menos espaiadas que no grupo S1. Na cocultura, em 24 horas, foram

observadas células com aspecto esférico e algumas células iniciando o espraiamento (Figura 4D-F).

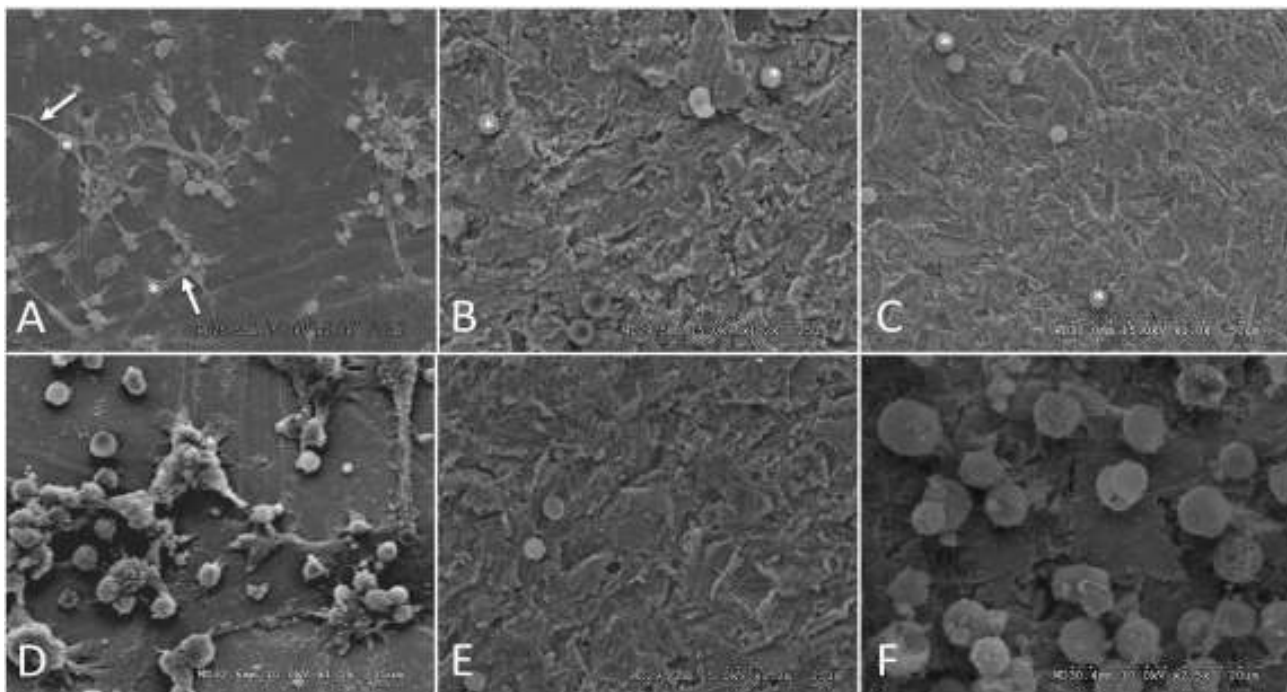


Figura 4: Células mononucleares (A, B, C) e coculturas (D, E, F) sobre as superfícies S1 (A, D), S2 (B, E) e S3 (C, F) no período de 24 horas. (→ indicam prolongamentos citoplasmáticos e (*) indicam células esféricas. Ampliação escrita em cada foto.

7.3. Análise ao microscópio de Fluorescência

As imagens obtidas ao microscópio de fluorescência (Figuras 5-7) demonstraram aspecto similar ao observado ao MEV. Em 7 e 14 dias, as células osteogênicas cultivadas sobre a superfície usinada (S1) apresentaram morfologia unidirecional, acompanhando as ranhuras do disco (Figuras 6B e 7B). Aos 7 dias, nas superfícies S2 e S3 (Figuras 6C e 6D), as células apresentaram aspecto estrelado ou poligonal, com morfologia multidirecional. No mesmo período, a cocultura parecia composta por células em diferentes estágios de diferenciação, apresentando células grandes, com longos prolongamentos, associadas à células esféricas ou ligeiramente estreladas (Figuras 6F-H). Aos 14 dias, apenas as superfícies S1 e S2 (Figura 7F, G) apresentavam-se recobertas por uma monocamada de células, o que não foi observado em S3 (Figura 7H).

Foi avaliada a porcentagem de células com intensa e visível marcação intracelular para as proteínas OPN e ALP, as quais estão intimamente relacionadas ao processo de diferenciação das células osteogênicas em osteoblastos e a conseqüente produção e mineralização da matriz extracelular.

Na cultura de células osteogênicas, em 24 horas, foi detectada diferença estatística significativa na porcentagem de células positivas para OPN entre os grupos S1 e S3 ($p < 0.03$, Figura 5A). A proteína foi observada na região perinuclear e também dispersa no citoplasma, embora também tenha sido verificada sua presença na matriz extracelular, a qual foi mais evidente nos grupos S2 e S3 (Figuras 5C-D). Na cocultura não foi encontrada diferença estatística significativa na porcentagem de células com marcação intracelular positiva para OPN entre as três superfícies (Figura 5E).

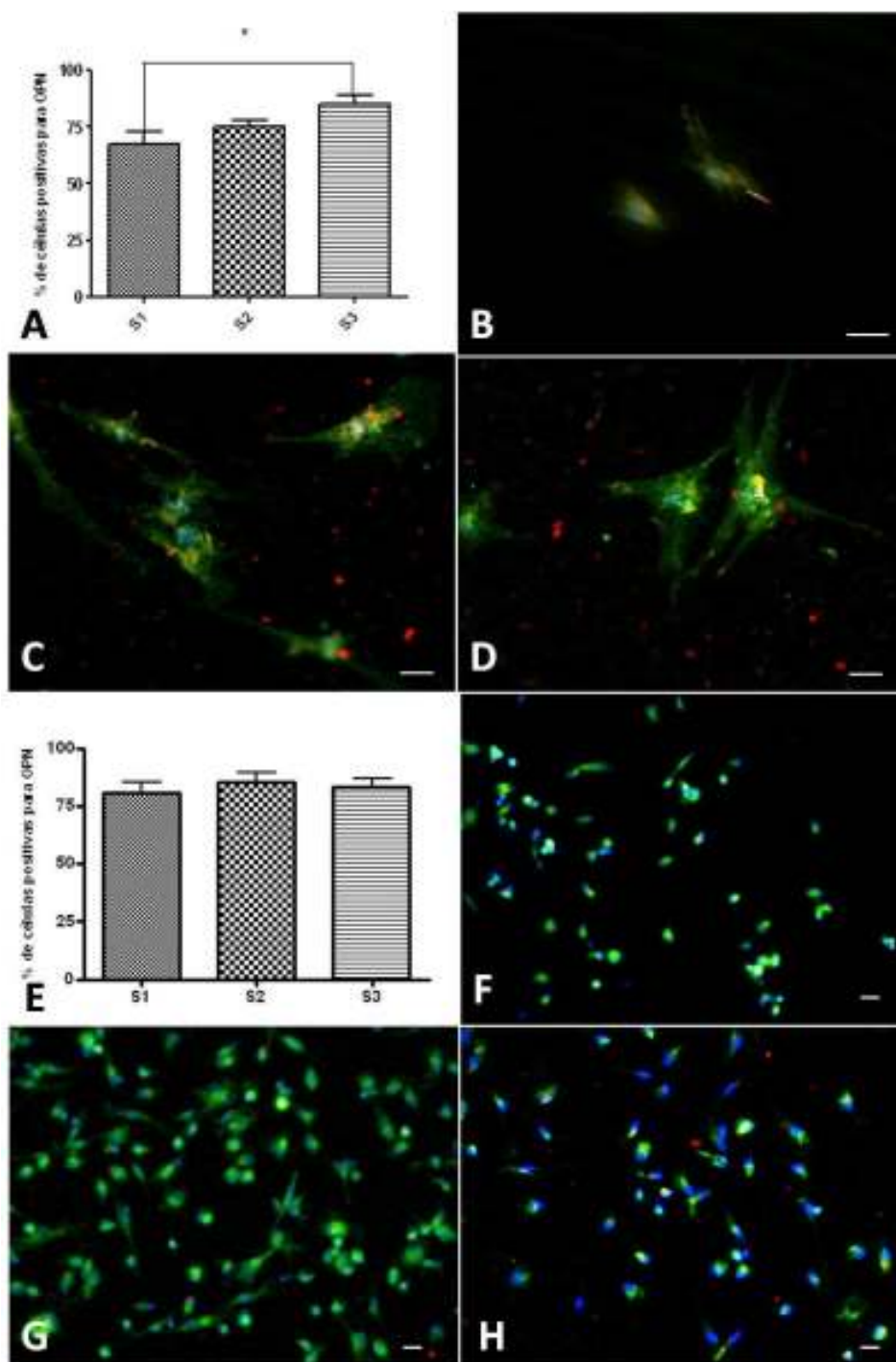


Figura 5: Porcentagem de células com marcação intracelular para OPN em 24 horas na cultura de células osteogênicas (A) e na cocultura (E) nas superfícies S1, S2 e S3 (resultados expressos em $\mu\pm EP$). Representação do aspecto morfológico e marcação intracelular das células osteogênicas (B=S1; C=S2; D=S3) e das coculturas (F=S1; G=S2; H=S3). Verde=citoesqueleto (F-act), vermelho=OPN, azul=núcleo (Hoechst), amarelo (sobreposição das marcações verde e vermelho). Barra=20 μm .

Em 7 e 14 dias, foi avaliada a porcentagem de células positivas para ALP na cultura de células osteogênicas e na cocultura (Figuras 6A,E e 7A,E, respectivamente). Em 7 dias, a

porcentagem de células positivas para ALP foi estatisticamente diferente entre os grupos S1 e S2, tanto na cultura de células osteogênicas ($p < 0.0065$, Figura 6A), como na cocultura ($p < 0.005$, Figura 6E). Esta proteína foi observada dispersa no citoplasma ou na matriz extracelular (Figura 6).

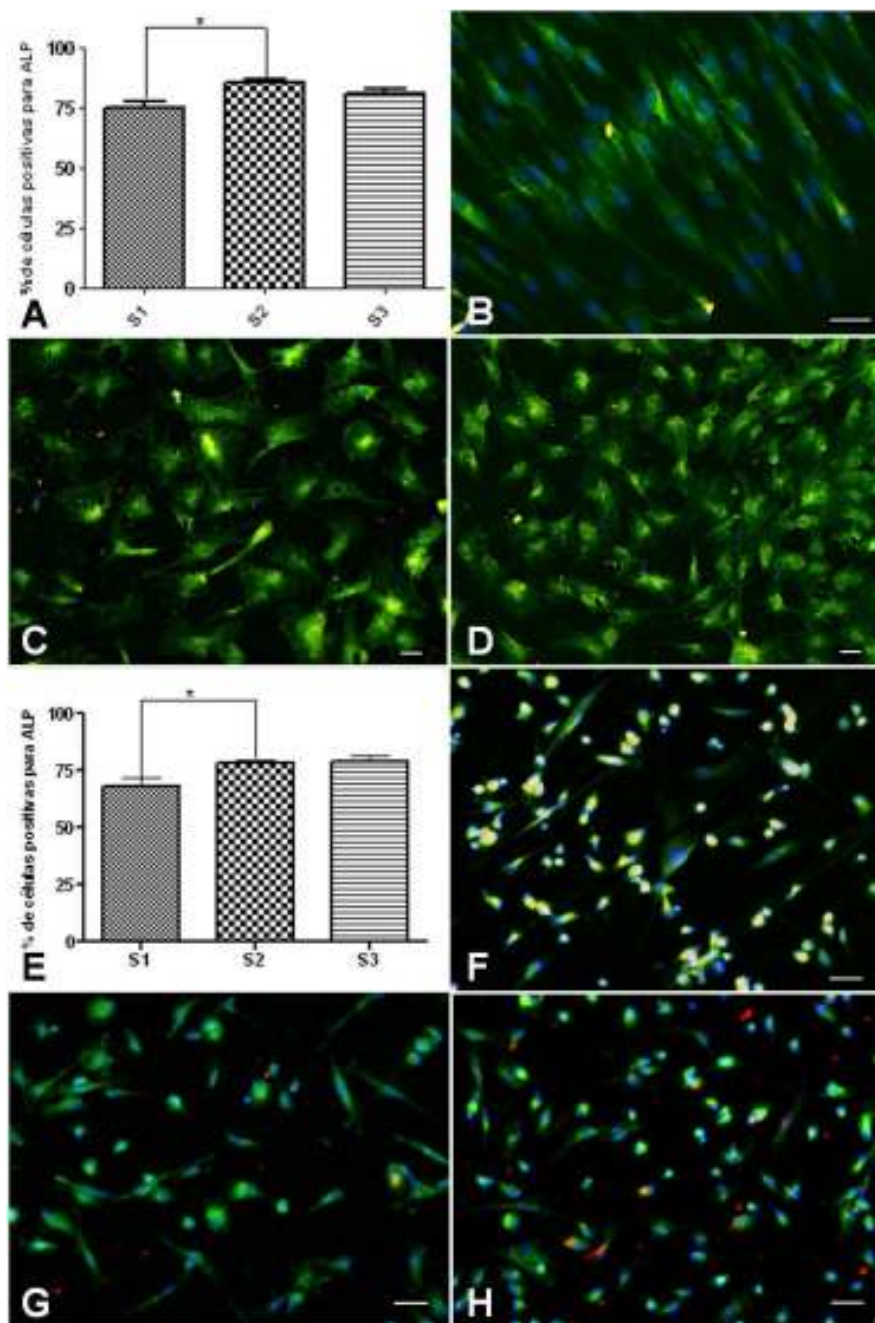


Figura 6: Porcentagem de células com marcação intracelular para ALP em 7 dias na cultura de células osteogênicas (A) e na cocultura (E) nas superfícies S1, S2 e S3 (resultados expressos em $\mu\pm EP$). Representação do aspecto morfológico e marcação intracelular das células osteogênicas (B=S1; C=S2; D=S3) e das coculturas (F=S1; G=S2; H=S3). Verde=citoesqueleto (Fal), vermelho=OPN, azul=núcleo (Hoechst), amarelo (sobreposição das marcações verde e vermelho). Barra=20 μm .

Em 14 dias, não houve diferença estatística significativa na porcentagem de células osteogênicas positivas para ALP entre os grupos ($p < 0,05$, Figura 7A). Entretanto, foi evidente o predomínio de marcação extracelular para ALP nos grupos S2 e S3 (Figuras 7C,D). Por outro lado, na cocultura (Figura 7), foi detectada diferença significativa na porcentagem de células positivas para ALP entre os grupos S2 e S3 ($p < 0,05$, Figura 7E), embora a marcação extracelular não tenha sido tão intensa e evidente (Figuras 7G,H) como a observada nas células osteogênicas cultivadas sobre as mesmas superfícies (Figuras 7C,D).

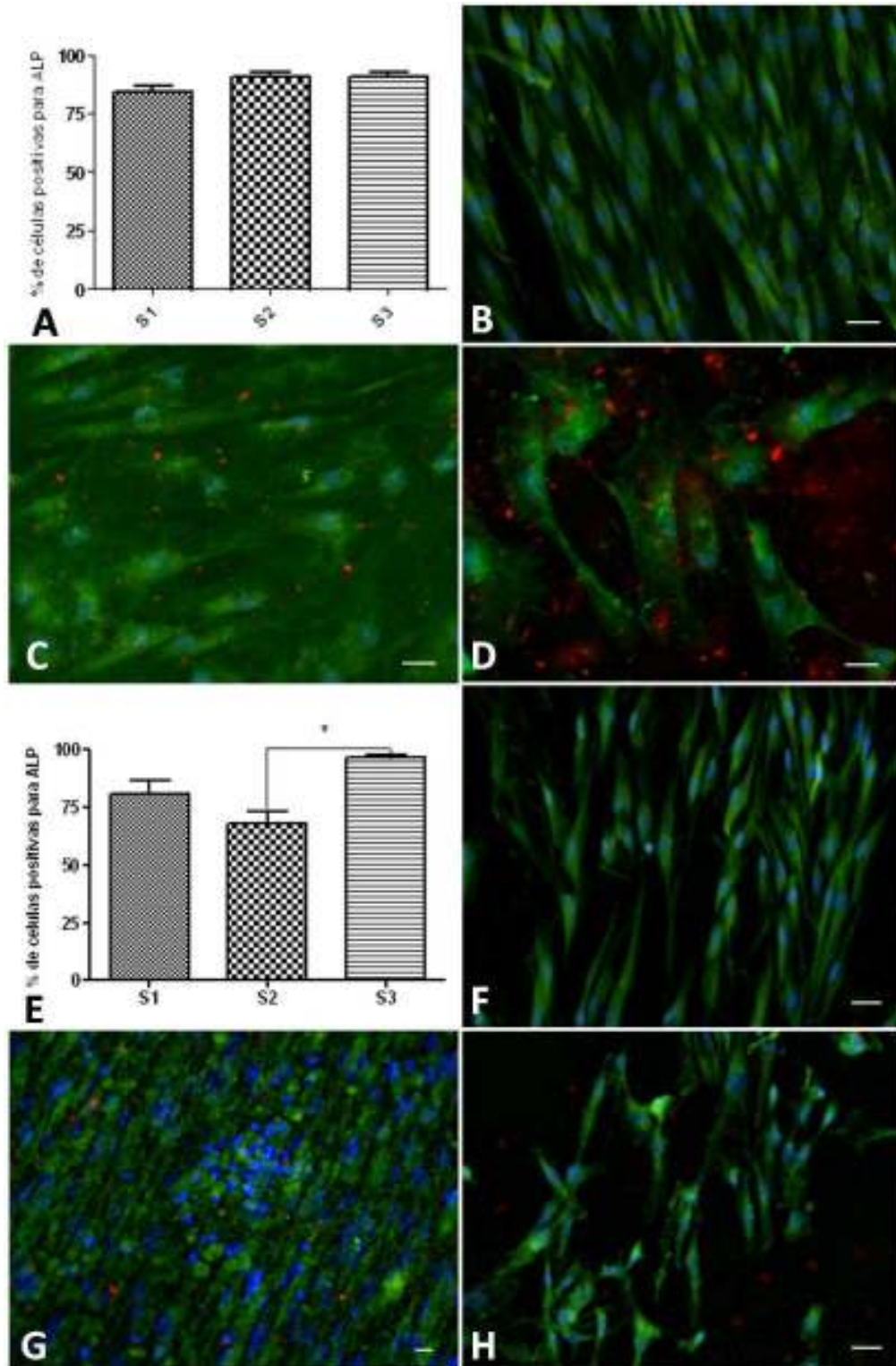


Figura 7: Porcentagem de células com marcação intracelular para ALP em 14 dias na cultura de células osteogênicas (A) e na cocultura (E) nas superfícies S1, S2 e S3 (resultados expressos em $\mu\pm EP$). Representação do aspecto morfológico e marcação intracelular das células osteogênicas (B=S1; C=S2; D=S3) e das coculturas (F=S1; G=S2; H=S3). Verde=citoesqueleto (Fal), vermelho=OPN, azul=núcleo (Hoechst), amarelo (sobreposição das marcações verde e vermelho). Barra=20 μm .

7.4. Quantificação das citocinas

O contato das células com superfícies de textura e composição química variada pode influenciar a produção de citocinas importantes, relacionadas com a regulação da inflamação e do processo de reparo. Neste estudo, foram quantificados os níveis de TGF β 1, IL1 β , IL10 e IL17 em culturas de células mononucleares, osteogênicas e em cocultura.

7.4.1 Quantificação dos níveis de citocinas nas culturas de células mononucleares (PBMC)

Na cultura de PBMC, as diferentes superfícies avaliadas não interferiram nos níveis de TGF β 1 e IL17 produzidas em 24 horas (Figuras 8A,B). No entanto, as células cultivadas sobre a superfície com nanorecobrimento (Grupo S3) produziram níveis de IL10 significativamente menores que as células dos demais grupos (S1 e S2; $p < 0,05$, Figura 8C). Já os níveis de IL1 β produzidos pelas células cultivadas nas superfícies tratadas (S2 e S3) foram significativamente menores quando comparados às células do grupo S1 ($p < 0,01$, Figura 8D).

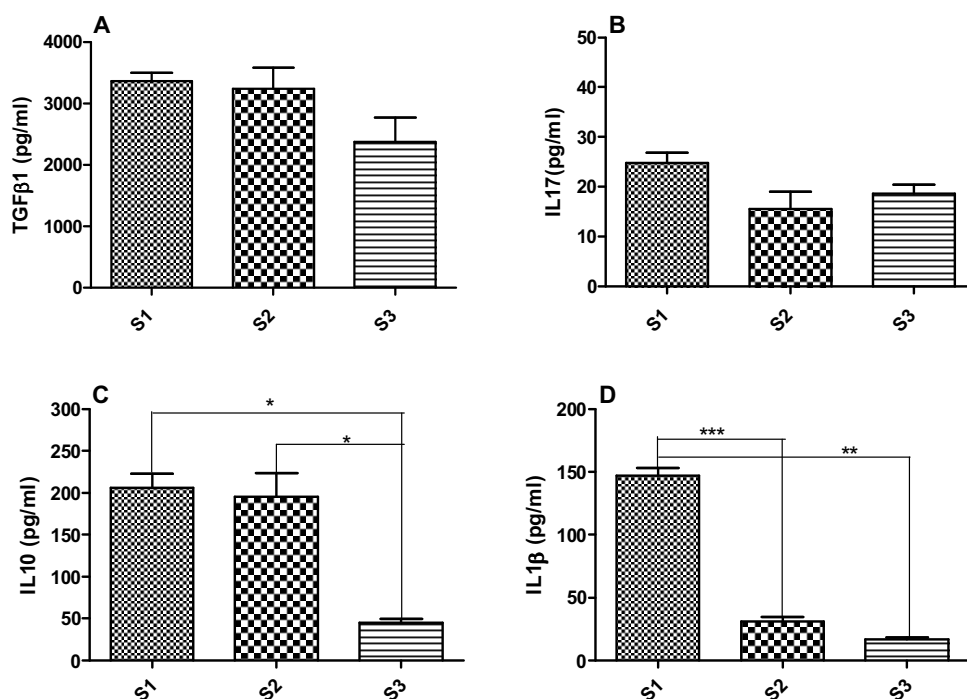


Figura 8 – Níveis de TGF β (A), IL17(B), IL10(C) e IL1 β (D), em cultura de células mononucleares cultivadas nas diferentes superfícies no período de 24 horas (S1, S2 e S3) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$). Resultados expressos em $\mu \pm EP$.

7.4.2 Quantificação dos níveis de citocinas nas culturas de células osteogênicas

O tipo de superfície sobre a qual as células osteogênicas foram cultivadas influenciou os níveis de produção das citocinas TGF β 1, IL1 β , e IL17, porém, não afetou a produção de IL10. Os níveis de IL10 produzidos pelas células osteogênicas em cada tempo experimental (24 horas, 7 dias e 14 dias), não foram influenciados pelas superfícies, não apresentando diferenças estatísticas significativas (Figura 9A).

Na cultura de células osteogênicas, os níveis de TGF β 1 em 24 horas, 7 e 14 dias não apresentaram diferenças significativas entre as superfícies S1 e S2. Contudo, houve diferença nos níveis desta citocina quando comparadas S2 e S3 ($p < 0.01$), e S1 e S3 ($p < 0,05$) nos mesmos períodos ($p < 0,05$, Figura 9B).

Os níveis de IL1 β em 24 horas não apresentaram diferenças estatísticas significantes em função da superfície sobre a qual a célula foi cultivada ($p = 0.768$, Figura 7C). Contudo, os níveis médios de IL1 β produzidos pelas células nas superfícies S1 e S2 no período de 7 dias apresentaram valores muito próximos. Já quando comparada a produção de IL1 β entre as células do grupo S1 e S3, assim como S2 e S3, observou-se aumento significativo da produção desta citocina ($P < 0.01$, Figura 9C). No período de 14 dias, apenas as células do grupo S1 apresentaram aumento significativo da produção de IL1 β em relação aos grupos S2 e S3 ($p < 0.001$, Figura 9C).

Os níveis de IL17 no período de 24 horas foram significativamente maiores nas células dos grupos S1 e S2 quando comparados ao grupo S3 ($p < 0,05$, Figura 9D). No sétimo dia de cultura, apenas as células do grupo S3 produziram esta citocina em níveis significativos quando comparados ao grupo S1 ($p < 0.01$). Aos 14 dias, não houve diferença nos níveis de IL17 detectados nos três grupos. Dados representados na figura 9D.

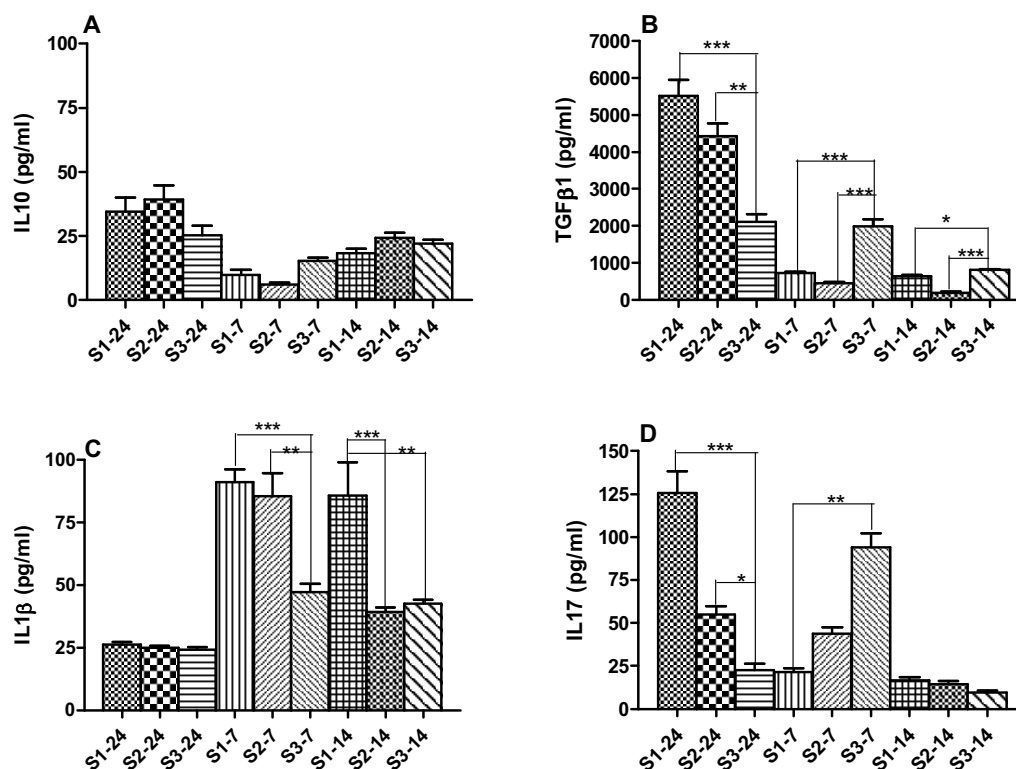


Figura 9 – Níveis de IL10 (A), TGFβ1 (B), IL1β (C) e IL17 (D), em cultura de células osteogênicas cultivadas nas diferentes superfícies (S1, S2 e S3) em 24 horas, 7 e 14 dias (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$). Resultados expressos em $\mu \pm EP$.

7.4.3 Quantificação dos níveis das citocinas nas coculturas

Em 24 horas, as células do grupo S3 produziram menores quantidades de IL10 quando comparadas às células dos demais grupos.(Figura 10A). Já em 7 dias, as células dos grupos S1 e S3 produziram maiores níveis desta citocina quando comparadas ao grupo S2 ($p < 0,05$, Figura 10A). Por outro lado, em 14 dias não houve diferença nos níveis de IL10 em todas as superfícies avaliadas.

Os níveis de TGFβ1 produzidos pelas células cocultivadas sobre as superfícies S1 e S3, nos períodos de 24 horas e 7 dias, apresentaram-se significativamente aumentados em comparação com o grupo S2 ($p < 0,05$, Figura 10B). No período de 14 dias, apenas as células cultivadas sobre a superfície S1 apresentaram níveis significantes de detecção em comparação com S2 e S3 ($p < 0.001$).

Os níveis de IL1β produzidos pelas células da cocultura não apresentaram diferenças significativas entre as superfícies nos períodos avaliados neste estudo (Figura 10C).

Nas coculturas de 7 e 14 dias detectou-se os maiores níveis de IL17 nos grupos S3 e S2, respectivamente ($p > 0,05$, Figura 10D).

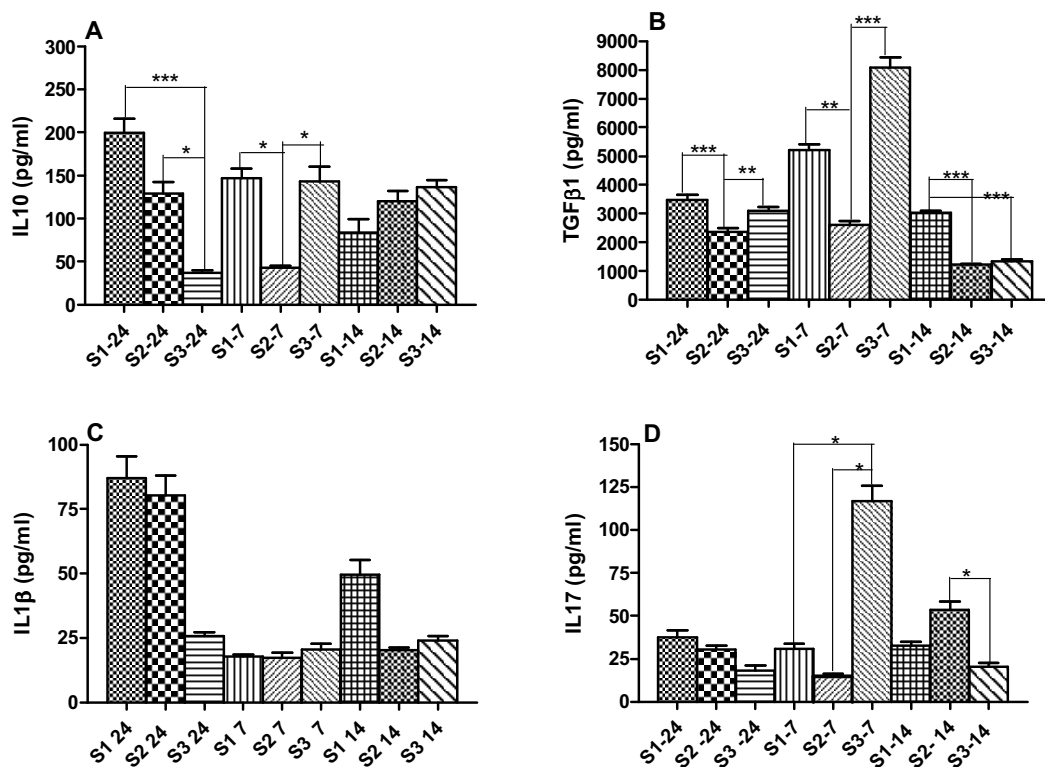


Figura 10 – Níveis de IL10 (A), TGFβ1 (B), IL1β (C) e IL17 (D), na cocultura (células mononucleares/osteogênicas) cultivadas nas diferentes superfícies (S1, S2 e S3) em 24 horas, 7 e 14 dias (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$). Resultados expressos em $\mu \pm EP$.

7.4.4. Análise da produção de citocinas ao longo do tempo

Ao longo do tempo cada cultura tende a apresentar um padrão de secreção de citocinas, o qual pode variar em função da superfície sobre a qual as células foram cultivadas. Os dados relativos à produção das citocinas TGFβ1, IL1β, e IL17 e IL10 nas culturas de células osteogênicas e na cocultura, ao longo do tempo, em cada superfície analisada estão representados nas Figuras 11 e 12.

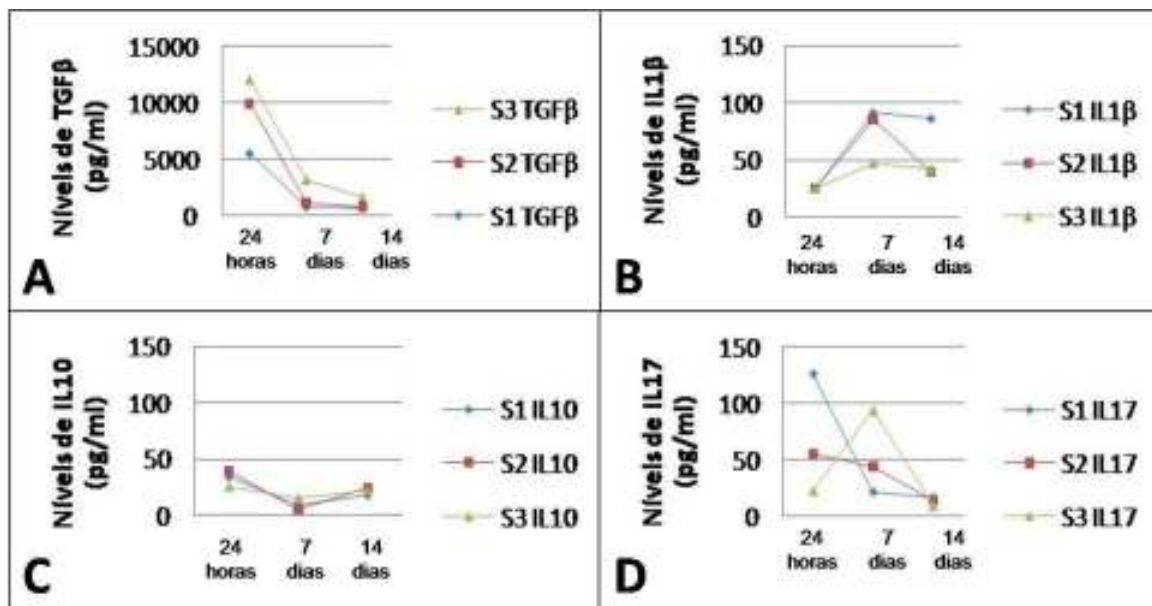


Figura 11: Cinética da produção de TGFβ1 (A), IL1β (B), IL10 (C) e IL17 (D) na cultura de células osteogênicas nos períodos de 24 horas, 7 dias e 14 dias. Resultados expressos em níveis médios.

Nas três superfícies avaliadas, os níveis de TGFβ1 produzido pelas células osteogênicas apresentaram valores mais elevados em 24 horas, com redução significativa aos 7 dias, mantendo-se praticamente constante até o 14º dia (Figura 11A). Já os níveis de IL1β, foram mais elevados no 7º dia de cultura, mantendo-se praticamente inalterados no 14º dia, exceto no grupo de células cultivadas sobre a superfície S2, no qual houve redução significativa dos níveis desta citocina para valores próximos aos detectados em 24 horas (Figura 11B). Os níveis de IL10 apresentaram-se ligeiramente elevados no período de 24 horas. Contudo, houve pequena redução em 7 dias e mantendo-se inalterado até o 14º dia para as três superfícies avaliadas (Figura 11C). Na cultura de células osteogênicas os níveis de IL17 variaram em função do tempo e da superfície (Figura 11D). No grupo de células cultivadas sobre a superfície S1, os maiores valores de IL17 foram detectados no período de 24 horas, diminuindo abruptamente aos 7 dias e mantendo-se constante até o 14º dia. Do mesmo modo, no grupo de células cultivadas sobre a superfície S2, os níveis mais elevados de IL17 foram detectados em 24 horas, apresentando pequena redução nos períodos seguintes. Em contraste, as células cultivadas na superfície S3 revelaram comportamento diferente em comparação às superfícies S1 e S2, na qual o pico da produção de IL17 foi detectado aos 7 dias de cultivo, com redução significativa aos 14 dias para valores próximos aos detectados em 24 horas (Figura 11D).

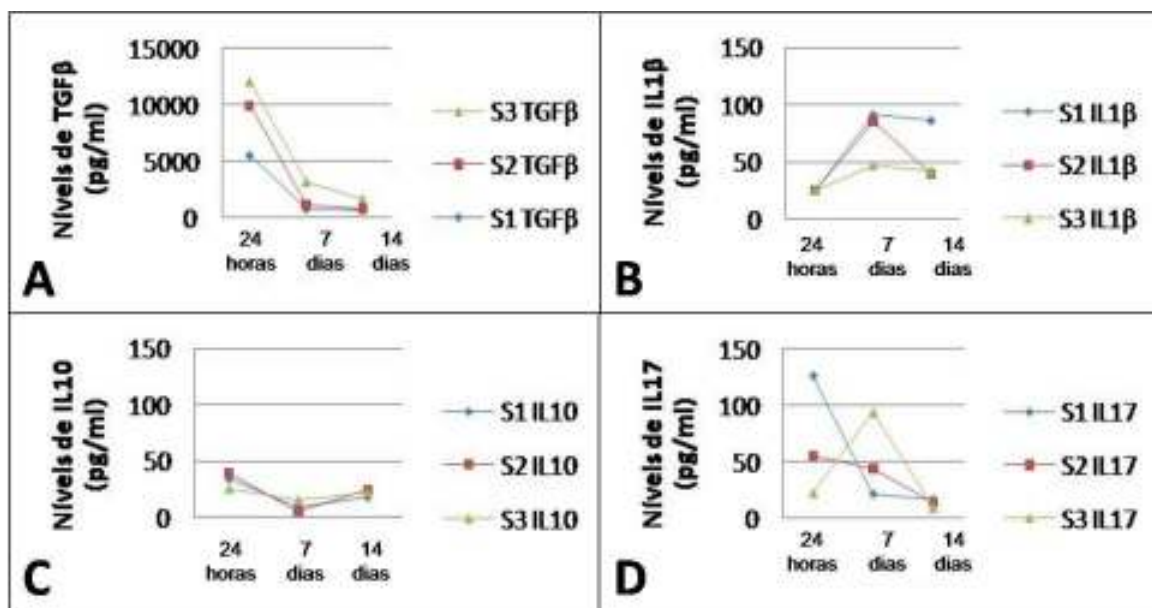


Figura 12: Cinética da produção de TGFβ1 (A), IL1β (B), IL10 (C) e IL17 (D) na cocultura (células mononucleares/osteogênicas) nos períodos de 24 horas, 7 dias e 14 dias. Resultados expressos em níveis médios.

Em coculturas sobre as três superfícies (S1, S2, S3), os níveis de TGFβ1 detectados apresentaram valores mais elevados em 7 dias, com redução significativa aos 14 dias (Figura 12A). Já os níveis de IL1β, foram mais elevados em 24 horas com redução significativa de detecção aos 7 dias, tanto para a células do grupo S1 quanto S2. Contudo, aos 14 dias os níveis IL1β voltaram aumentados nas células do grupo S1, mantendo-se praticamente inalterados nos grupos S2 e S3 (Figura 12B). Nas coculturas sobre as superfícies S1 e S2, foram detectados níveis elevados de IL10 no período de 24 horas, com redução significativa em 7 dias. Porém houve aumento da detecção dessa citocina em 14 dias nas coculturas do grupo S2 (Figura 12 C). Já as coculturas em S3, o pico de produção de IL10 foi detectado aos 7 dias, mantendo-se constante até o 14º dia. (Figura 12C). Os níveis de IL17 variaram em função do tempo e da superfície (Figura 12D). No grupo S2 houve pequena redução dos níveis de IL17 no intervalo de 1-7 dias, apresentando aumento substancial aos 14 dias. Ao contrário, nas células do grupo S3, os maiores valores de IL17 foram detectados aos 7 dias, com redução drástica aos 14 dias. Apenas nas células do grupo S1 os níveis de IL17 mantiveram-se praticamente inalterados em função do tempo (Figura 12D).

7.4.5. Comparação entre os níveis de citocinas nas culturas de células osteogênicas e na cocultura (células mononucleares/osteogênicas)

As coculturas produziram os maiores níveis de IL10 em comparação com as células osteogênicas no período de 24 horas. Contudo, apenas a cocultura do grupo S1 apresentou diferenças estatisticamente significantes (Figura 13A). Por outro lado, no período de 7 dias os níveis de IL10 produzidos pelas células da cocultura foram significativamente maiores em todas as superfícies quando comparadas às culturas de células osteogênicas ($p < 0,05$, Figura 13B). Do mesmo modo, no período de 14 dias foi verificada maior detecção nos níveis desta citocina em comparação com as células osteogênicas ($p < 0,05$, Figura 13C).

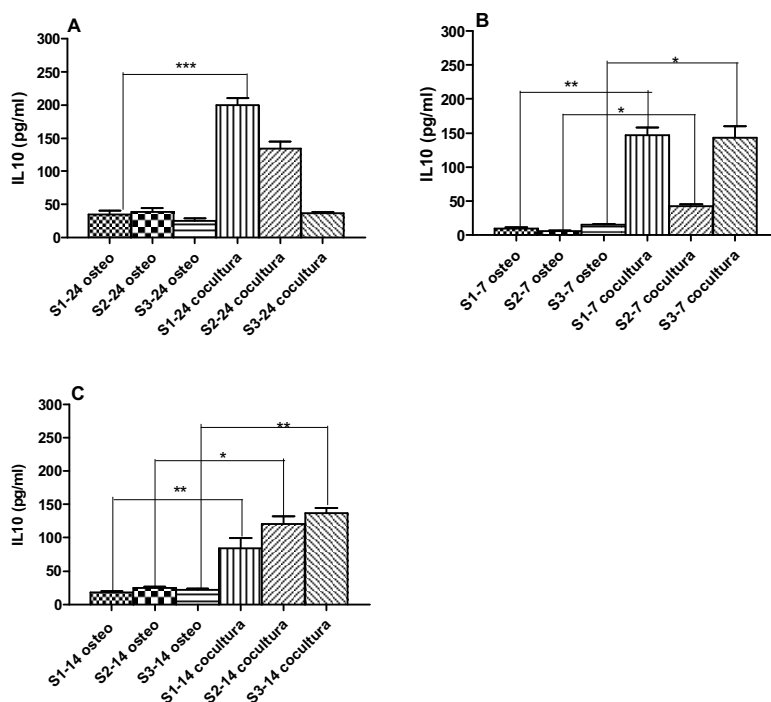


Figura 13: Comparação entre os níveis de IL10 nas culturas de células osteogênicas e na co-cultura (células mononucleares/osteogênicas), cultivadas nas diferentes superfícies (S1, S2 e S3) em 24 horas (A), 7 dias (B) e 14 dias (C) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$). Resultados expressos em $\mu \pm EP$.

No período de 24 horas, os níveis de produção de TGF β 1 não diferiram entre as células osteogênicas e a cocultura dos grupos S1 e S3. Já as células osteogênicas do grupo S2 produziram quantidades elevadas nesse período ($p < 0,001$, Figura 14A). No período de 7

dias, houve aumento significativo dos níveis desta citocina em todos os grupos (S1, S2 e S3; $p < 0,05$, Figura 14B). Contudo, no período de 14 dias, os níveis de TGF β 1 mantiveram-se inalterados nas células do grupo S3, apresentando aumento significativo nas coculturas dos grupos S1 ($p < 0,005$) e S2 ($p < 0,05$, Figura 14C).

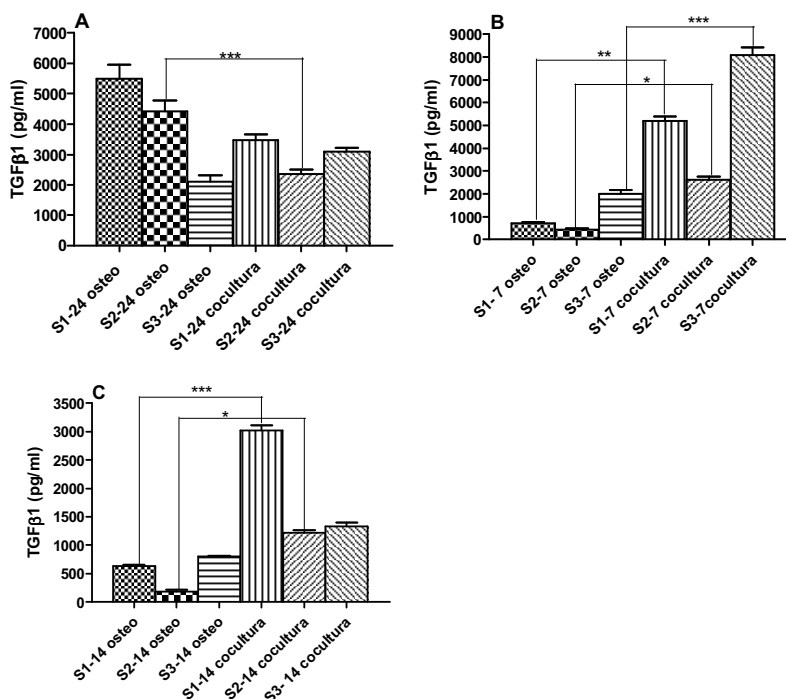


Figura 14: Comparação entre os níveis de TGF β 1 nas culturas de células osteogênicas e na cocultura (células nucleares/osteogênicas), cultivadas nas diferentes superfícies (S1, S2 e S3) em 24 horas (A), 7 dias (B) e 14 dias (C) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$). Resultados expressos em $\mu \pm EP$.

Em 24 horas, os níveis de IL1 β na cocultura apresentaram aumento significativo nos grupos S1 e S2, quando comparados aos níveis nas células osteogênicas (Figura 15A). Por outro lado, no período de 7 dias, as culturas de células osteogênicas dos grupos S1 e S2, produziram níveis maiores de IL1 β em comparação à cocultura (Figura 15B). Aos 14 dias, apenas a cultura do grupo S3 estava significativamente aumentada em relação à cocultura ($p < 0,05$, Figura 15C).

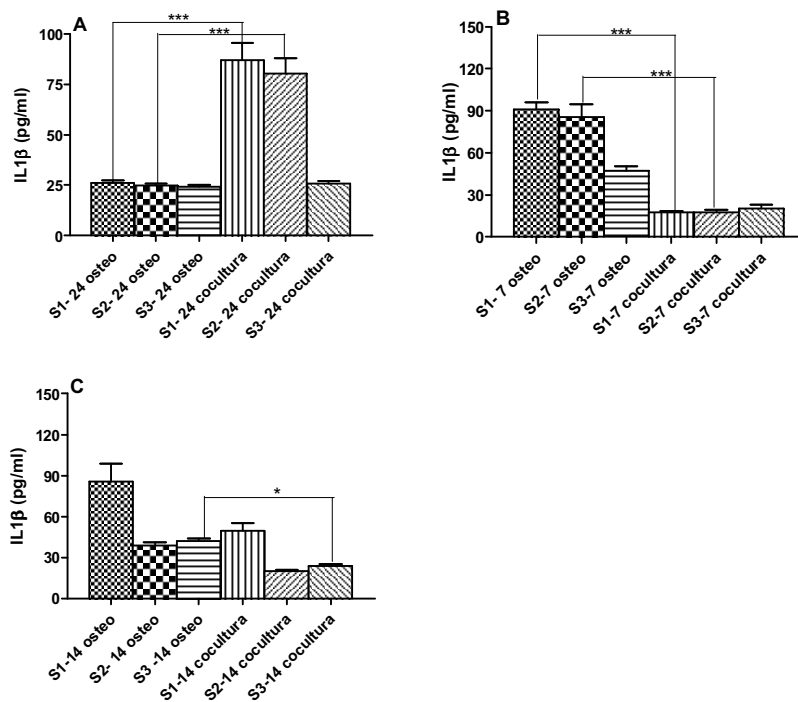


Figura 15: Comparação entre os níveis de IL1 β nas culturas de células osteogênicas e na cocultura (células mononucleares/osteogênicas), cultivadas nas diferentes superfícies (S1, S2 e S3) em 24 horas (A), 7 dias (B) e 14 dias (C) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$). Resultados expressos em $\mu \pm EP$.

Os níveis de IL17 não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre a cocultura e a cultura sobre as três superfícies de titânio ($p < 0,05$), no período de 24 horas (Figura 16A). Em 7 dias foi detectada maior produção de IL17 em células osteogênicas cultivadas na superfície S2 em comparação à cocultura ($p < 0,05$, Figura 16B). Por outro lado, no período de 14 dias, a maior produção de IL17 foi observada na cocultura dos grupos S1 e S2 ($p < 0,001$, Figura 16C).

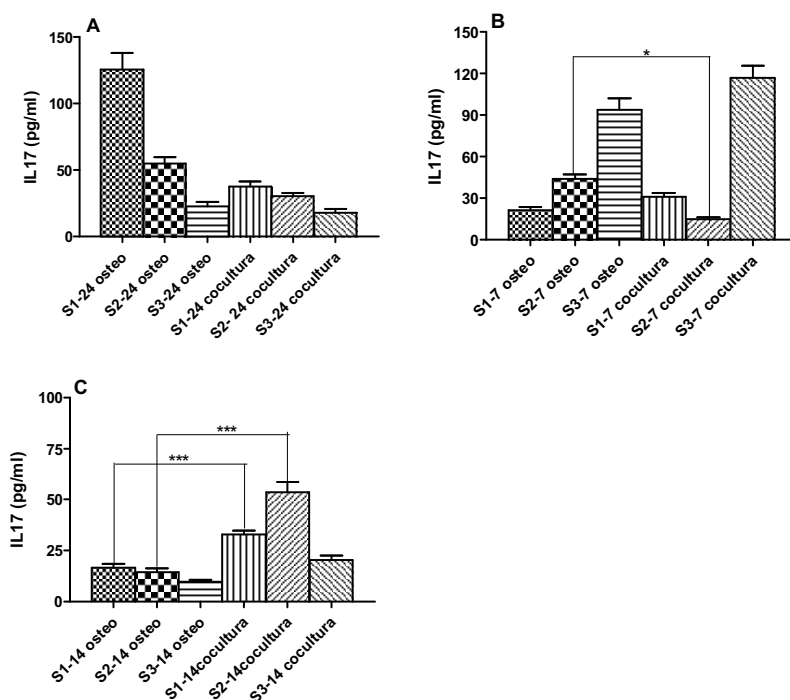


Figura 16: Comparação entre os níveis de IL17 nas culturas de células osteogênicas e na cocultura (células monucleares/osteogênicas), cultivadas nas diferentes superfícies (S1, S2 e S3) em 24 horas (A), 7 dias (B) e 14 dias (C) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$). Resultados expressos em $\mu \pm EP$.

7.4.6. Comparação entre os níveis de citocinas na cultura de PBMC e na cocultura (células monucleares/osteogênicas)

Os níveis das citocinas IL10, TGF β 1 e IL17 não apresentaram diferenças significativas entre a cultura de células mononucleares e a cocultura, em nenhuma das superfícies avaliadas no período de 24 horas (Figura 17). No entanto, foram detectadas diferenças significativas na produção de IL1 β nas células do grupo S1, S2 e S3 ($p < 0,01$) quando comparadas à cultura de PBMC e à cocultura ($p < 0,05$, Figura 17C).

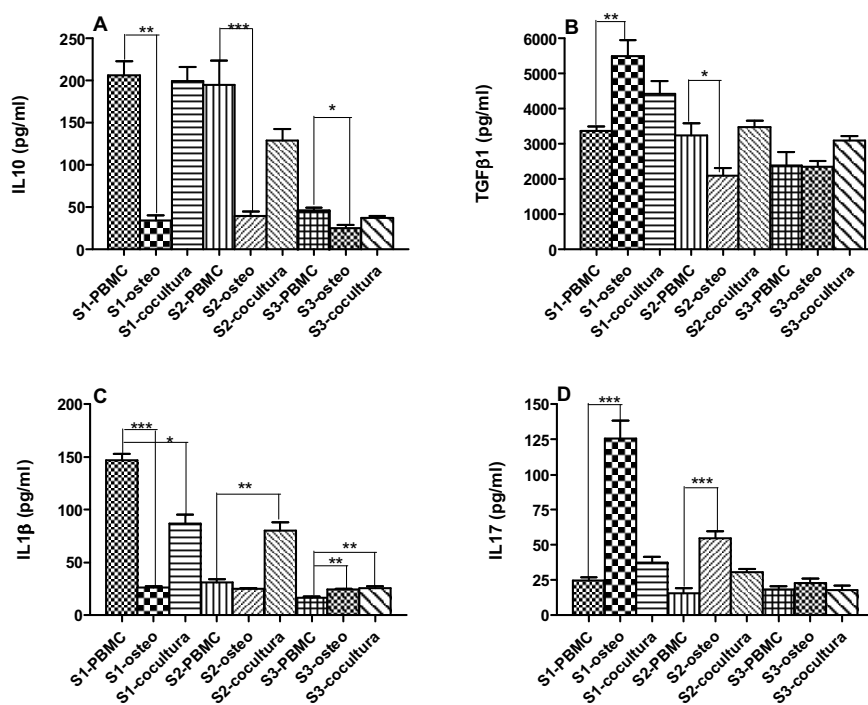


Figura 17 – Comparação entre os níveis de citocinas IL10 (A), TGFβ1 (B), IL1β (C) e IL17 (D), nas culturas de mononucleares (PBMC), osteogênicas e na cocultura (células monucleares/osteogênicas), nas diferentes superfícies S1, S2 e S3 em 24 horas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$). Resultados expressos em $\mu \pm EP$.

Por outro lado, quando comparados os níveis de IL10 produzidos pelas culturas de PBMC e pelas células osteogênicas houve diferença estatística significativa nas três superfícies avaliadas ($p < 0,05$, Figura 17A). Além disso, quando avaliados os níveis de TGFβ1 (Figura 17B) e IL17 (Figura 17D) produzidos pelas duas culturas, apresentaram diferenças significativas apenas nos grupos S1 e S2 ($p < 0,05$). Já os níveis de IL1β produzidos pelas células osteogênicas foram significativamente menores que os produzidos pelos PBMC ($p < 0,05$) no grupo S1 (Figura 17C), enquanto no grupo S3 foram significativamente maiores nas células osteogênicas que na cocultura.

8. Discussão

O presente estudo avaliou o comportamento de células humanas sobre ligas de Titânio-Alumínio-Vanádio (Ti-6Al-4V). Os resultados obtidos demonstraram que os eventos iniciais da osteogênese, tais como adesão, proliferação celular, produção de citocinas e proteínas não colágenas relacionadas ao processo de biomineralização (osteopontina e fosfatase alcalina) são influenciados pela interação célula-superfície. Várias pesquisas já haviam confirmado a influência da rugosidade de superfície sobre a resposta dos osteoblastos (MUSTAFA *et al.*, 2001; DE OLIVEIRA E NANJI, 2004; SADER *et al.*, 2005; ZING *et al.*, 2005; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; SCHWARTZ *et al.*, 2007), apresentando resultados favoráveis para as superfícies com microtopografia (BOYAN *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2004; ZINGER *et al.*, 2005; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007). No entanto, poucos estudos (RICE *et al.*, 2003; VALLÉS *et al.*, 2008) avaliaram o efeito das modificações na superfície do titânio sobre a resposta de outras células importantes no processo de reparo, como os mononucleares e também a interação dessas células com os osteoblastos (CURRAN *et al.*, 2005).

Neste estudo, as células foram cultivadas sobre superfícies de titânio comercialmente disponíveis, as quais diferem quanto à composição química, uma vez que a superfície S3 apresenta nanorecobrimento de cálcio-fostato (Ca e P). Esses íons participam do processo de biomineralização e podem influenciar a diferenciação de células osteoprogenitoras no fenótipo de osteoblasto, assim como favorecer a adesão e proliferação celular acelerando o processo de osteogênese (RICE *et al.*, 2003; ERGUN *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008). No entanto, os benefícios de superfícies bioativas com Ca e P dependem da estabilidade e taxa de dissolução dessa cobertura (LIU *et al.*, 2008; MILLER *et al.*, 2008; COELHO *et al.*, 2009 A). Alguns estudos têm demonstrado que as superfícies com recobrimento de Ca e P podem ativar macrófagos, induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, retardando o processo de reparo. (SILVA *et al.*, 2003).

Buscando mimetizar os eventos biológicos que ocorrem após a instalação de um implante, optou-se pela realização de culturas primárias de células humanas. Estudos prévios demonstraram que a interação célula-superfície e o padrão de resposta variam em função do tipo de célula utilizada nos experimentos (AKINTOYE *et al.*, 2008; PERINPAMAYAGAM *et al.*, 2006; CLOUSEN *et al.*, 2006). Osteoblastos e macrófagos provenientes de linhagem não apresentam o mesmo comportamento que culturas primárias obtidas de humanos ou roedores (DAVIES, 2000). Akintoye *et al.* (2006, 2008) demonstraram que células osteogênicas obtidas de sítios extra-orais apresentam fenótipo diferente e não respondem da

mesma forma a estímulos externos. Tendo em vista que as superfícies utilizadas correspondem à de implantes dentais, as potenciais variações em função do sítio de origem das células justificam a escolha do mento como área doadora no presente estudo.

As células enzimaticamente isoladas do tecido ósseo compõem uma população mista, em vários estágios de diferenciação, denominadas de células osteogênicas. Estas não receberam nenhum agente indutor após o plaqueamento sobre as superfícies de titânio, permitindo avaliar exclusivamente o efeito que a cobertura de Ca e P tem sobre as células, assim como o efeito dos mediadores liberados pelas células mononucleares nas coculturas. Tendo em vista que adesão e proliferação são os primeiros eventos observados após o contato célula-superfície, esses parâmetros foram avaliados na cultura de mononucleares e de células osteogênicas. Como observado por outros investigadores (DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; RAUSCH-FAN *et al.*, 2008), a rugosidade e a composição química das superfícies não influenciaram na viabilidade celular, e apresentaram valores próximos aos detectados na superfície usinada (controle), demonstrando a biocompatibilidade das superfícies.

A proliferação celular (1-7 dias) avaliada apenas na cultura de células osteogênicas, apresentou aumento significativo na superfície S3. Considerando que as células foram mantidas em meio sem agentes indutores, como por exemplo o ácido ascórbico, é provável que a composição química da superfície tenha apresentado influência positiva na proliferação celular desse grupo.

Estudos anteriores demonstraram a importância da adesão celular de macrófagos (GRETZER *et al.*, 2003; REFAI *et al.* 2004; VALLÉS *et al.* 2008; CIAPETTI *et al.* 2005) e osteoblastos (CIAPETTI *et al.* 2005; VALLÉS *et al.* 2008; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007) nas etapas que seguem o processo de reparo. No presente estudo não foram encontradas diferenças entre as superfícies no número de PBMC aderidas em 24 horas. Estes resultados diferem dos observados por Salthouse (1984) e Refai *et al.* (2004) os quais encontraram variações nas taxas de adesão dos macrófagos em função da rugosidade e composição química da superfície. Resseti (2005), em estudo utilizando mononucleares obtidos da medula óssea, verificou que essas células, sobretudo a população de monócitos apresenta boa adesão após 72 horas e os procedimentos realizados no preparo das amostras para análise ao microscópio podem levar ao desprendimento das células, o que pode ter influenciado nossos resultados. No entanto, em relação às células osteogênicas, foram observadas variações na taxa de adesão em função das características físico-químicas das superfícies. Em 24 horas foi observada melhor adesão e proliferação nas superfícies S2 e S3, as quais apresentam a mesma rugosidade, embora não tenham as mesmas características químicas. A superfície S1 (usinada)

mostrou as menores taxas de adesão neste período, sugerindo a preferência de células osteogênicas por superfícies com rugosidades em torno de 60 μm . (COELHO *et al.*, 2009 A).

Aos sete dias, foi observada uma inversão nas taxas de adesão celular do grupo S3, as quais foram significativamente menores que as encontradas em S1. Esses dados sugerem que, a adesão inicial favorecida nas primeiras 24 horas pela microtopografia, modificou-se aos sete dias, provavelmente devido ao reconhecimento do substrato pelas células, ou à sua dissolução, resultando em menores taxas de adesão.

Uma vez aderidas ao substrato, as células osteogênicas iniciam o processo de diferenciação e maturação celular, passando a expressar genes específicos de osteoblastos como o *Cbfa1* e também a produzir proteínas não colágenas relacionadas à biomineralização, como osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP), osteocalcina (OC) e fosfatase alcalina (ALP) (DAVIES, 2000; DE OLIVEIRA & NANCI, 2004; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007)

No presente estudo, foi avaliada a marcação intracelular para OPN e ALP na cultura de células osteogênicas e na cocultura, apresentando resultados que diferiram não somente em função das superfícies nas quais as células foram cultivadas, mas também em função da interação celular sobre essas superfícies. Em 24 horas as células osteogênicas do grupo S3 apresentaram maior marcação intracelular positiva para OPN, sugerindo favorecimento da nanocobertura no processo inicial de diferenciação celular. No entanto, no mesmo período, as células da cocultura não apresentaram diferenças significativas na marcação para OPN em função da superfície, sugerindo que a interação celular foi mais importante que a rugosidade ou a constituição química da superfície no direcionamento dos eventos ligados a diferenciação celular. Embora não quantificada, a marcação extracelular para OPN foi mais evidente nos grupos S2 e S3, nas duas modalidades de cultura. Porém, segundo de Oliveira *et al.* (2007), não se sabe ao certo a importância da marcação extracelular mais evidente para OPN no favorecimento da biomineralização.

A fosfatase alcalina, marcador final da diferenciação de células osteogênicas em osteoblastos e também responsável pela mineralização da matriz, foi detectada em menores quantidades na superfície S1 aos sete dias, tanto na cultura de células osteogênicas, como na cocultura, sugerindo que o tratamento de superfície e as interações celulares agiram concomitantemente na produção de ALP. Os valores mais elevados obtidos no grupo S2 indicaram que a composição química da superfície não foi mais importante que rugosidade no período de sete dias, em ambas as culturas. Nesse período a interação osteoblastos-mononucleares não se sobrepôs à interação célula-superfície. Porém, aos 14 dias a influência recíproca entre mononucleares e células osteogênicas (cocultura), associadas às características

de superfície, resultaram em maior proporção de células positivas no grupo S3, quando comparado ao grupo S2. Essa diferença não foi encontrada nas culturas de células osteogênicas no mesmo período, embora a marcação extracelular tenha sido intensa e evidente nas duas superfícies tratadas (Grupos S2 e S3), reforçando a idéia de que tanto a superfície quanto a interação celular são importantes na neo-osteogênese.

A morfologia das células osteogênicas cultivadas sobre as três superfícies está de acordo com resultados previamente descritos na literatura (DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; ROSA *et al.*, 2009), mostrando espraiamento celular aos sete dias nos grupos com superfícies tratadas e alinhamento celular com as ranhuras do disco no grupo S1. Aos 14 dias, as três superfícies apresentaram-se recobertas, formando uma mono-camada. Na co-cultura, a morfologia das células foi similar à observada na cultura de células osteogênicas, porém as células tinham um aspecto menor e menos espraiado. Tal fato poderia ser justificado pela interação entre as células, influenciando no direcionamento das mesmas.

Além da importância das superfícies nas interações celulares que conduzem aos eventos de adesão, proliferação e produção de proteínas relacionadas à mineralização, citocinas liberadas frente a qualquer agressão proveniente de procedimentos cirúrgicos, como a instalação de implantes, podem influenciar na velocidade do processo de reparo. Investigações *in vitro* têm sido desenvolvidas com o propósito de elucidar os vários aspectos das interações celulares com biomateriais (GRETZER *et al.*, 2003; CURRAN *et al.*, 2005). Neste contexto, utilizando modelo de interação célula-biomaterial, foram avaliadas citocinas chaves no processo de reparo com papel pró-inflamatório (IL1 β), anti-inflamatório (TGF β 1) e modulatório (IL10), além de uma citocina com papel ambíguo (IL17).

A IL1 β é conhecida por regular a formação e reabsorção óssea, estimulando osteoclastos (GRETZER *et al.*, 2003; CURRAN *et al.*, 2005; HUGHES *et al.*, 2006). No presente estudo, os níveis de IL1 β foram maiores nas células mononucleares cultivadas sobre superfícies lisas, resultados opostos aos observados por Gretzer *et al.* (2003). Contudo, esses autores trataram previamente as superfícies utilizadas com LPS, o que aumenta a produção de IL1. Já na cultura de osteoblastos, os níveis desta citocina variaram em função das superfícies e do tempo. Segundo Spyrou *et al.* (2002), todos os tipos de superfície são capazes de estimular a produção de IL1, embora seus efeitos sobre as células ósseas em cultura sejam complexos (TANABE *et al.*, 2004) e divergentes (HUGHES *et al.*, 2006). Além disso, osteoblastos cultivados sobre superfícies com Ca e P normalmente produzem baixos níveis de IL1 (RICE, HUNT & GALGHER, 2003), dados também encontrados no presente estudo.

Os níveis de IL1 β diferiram nos períodos de 7 e 14 dias entre as superfícies (S1, S2, S3) na cultura de células osteogênicas, apresentando os níveis mais elevados no grupo S1. Desse modo, pode-se especular que a rugosidade das superfícies S2 e S3 mimetizou o microambiente propício para as células osteogênicas, resultando em menor produção de IL1 β nessas superfícies. No entanto, essas diferenças não foram encontradas nas coculturas, sugerindo que as células se influenciaram mutuamente e que o modelo biológico usando cocultura aproxima-se mais dos parâmetros analisados *in vivo*, onde diferentes tipos celulares interagem durante o processo de reparo (DAVIES, 2000; PUELO & NANCI, 1999). Ao comparar as culturas de células osteogênicas e as coculturas sobre as diferentes superfícies, verificou-se diminuição dos níveis de IL1 β nas coculturas a partir de 24 horas, sugerindo diminuição da resposta inflamatória favorecida pela interação celular.

Durante os estágios iniciais de formação óssea, a ação da TGF β 1 é recrutar e estimular a proliferação de células osteoprogenitoras (DAVIES, 2000; HUGHES *et al.*, 2006). No entanto, segundo Kanaan e Kanaan (2006), efeitos divergentes de TGF β 1 na formação óssea tem sido descritos *in vivo* e *in vitro*, dependendo das condições experimentais, das células empregadas e do estágio de maturação das mesmas. No presente estudo, a produção de TGF β 1 pelas células osteogênicas foi favorecida na superfície S1 no período de 24 horas, embora aos 7 e 14 dias a superfície S3, com nanorecobrimento de Ca e P, tenha estimulado maior produção de TGF β 1. Estes dados estão de acordo com os descritos por Boyan *et al.* (2003) e Zinger *et al.* (2008) que demonstram um favorecimento na produção de TGF β 1 em osteoblastos cultivados sobre superfícies rugosas. No entanto, a interação celular entre mononucleares e células osteogênicas observada na cocultura, modifica esses parâmetros, sugerindo mais uma vez a importância das interações celulares sobre as superfícies de titânio na liberação de mediadores.

Quando comparadas as duas modalidades de cultura, os níveis de TGF β 1 foram sempre maiores na cocultura nos períodos de 7 e 14 dias, independente da superfície utilizada. No entanto, segundo Huges *et al.* (2006) a liberação de TGF β 1 nas fases tardias pode bloquear a diferenciação osteoblástica e a mineralização, o que talvez possa estar relacionado ao menor grau de maturação das células osteogênicas observados no presente trabalho quando se avaliou a morfologia dessas células em microscópio de fluorescência.

Inicialmente, atribuía-se a produção de IL10 apenas aos linfócitos. Contudo, tem sido descrito que várias outras células, dentre elas os osteoblastos, são capazes de produzi-la (GARCIA-LOPEZ *et al.*, 2005). Essa citocina apresenta papel regulatório e sua secreção é estimulada por outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF α , IL1 β e PGE2 (DE WAAL

et al., 1991; GRETZER *et al.*, 2003). Neste estudo, os níveis de IL10 nas culturas de mononucleares foram significativamente menores na superfície S3, o que também foi observado em relação à IL1 β . Dessa forma, estes baixos níveis de IL10 podem estar relacionados à regulação negativa promovida pela citocina IL1 β .

Na cultura de células osteogênicas, os níveis de IL10 foram baixos, não diferindo entre as superfícies, o que pode ter sido influenciado pela ausência de estímulos promovida pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (GRETZER *et al.*, 2003). Já na cocultura, as variações dos níveis de IL10 entre as superfícies nos períodos de 24 horas e 7 dias sugerem uma cinética de produção diferente em função do material utilizado, assim como os efeitos autócrinos e parácrinos devido à interação celular. Tal fato é observado ao se comparar os níveis de IL10 na cultura de células osteogênicas e nas coculturas durante os períodos tardios, verificando sempre maiores valores nas coculturas, onde a regulação provavelmente é exercida pela variedade de mediadores liberados pelas diferentes populações celulares.

A IL17, uma citocina recentemente descoberta, modula os estágios iniciais da resposta imune (BROXMEYER *et al.*, 1995; KOLLS & LINDEN, 2004). Inicialmente acreditava-se que esta citocina possuía um caráter essencialmente pró-inflamatório, sendo liberada apenas por linfócitos (KAWAGUCHI *et al.*, 2004; KOLLS & LINDEN, 2004). Hoje sabe-se que possui um papel ambíguo, podendo atuar como pró-inflamatória e como regulatória, embora os mecanismos que regulam sua produção não estejam esclarecidos (BI, LIU, YANG 2007; RUDDY *et al.*, 2004). Tem-se considerado seu impacto sobre o “turn over” ósseo, sobretudo em doenças inflamatórias como a artrite (YAGO *et al.*, 2007; UDAGAWA *et al.*, 2002), porém pesquisas recentes indicam também um papel protetor na doença periodontal (YU *et al.*, 2007). Embora não existam trabalhos prévios sobre IL17 em culturas celulares em diferentes superfícies de titânio, os dados do presente estudo sugerem que essa citocina teve um papel principalmente regulatório. Seus níveis, tanto nas culturas de osteoblastos como nas coculturas, variaram em função do tempo, porém foram baixos, com valores sempre maiores na coculturas, indicando mais uma vez a cooperação celular na regulação da resposta imune, independente do biomaterial utilizado. Pode-se especular também que a IL17 tenha um papel modulatório juntamente com a TGF β 1 e IL1 β em função do tempo de cultura, já que trabalhos anteriores demonstraram a interação entre estas citocinas no processo de formação e reabsorção óssea (YU *et al.*, 2007; PINKERTON *et al.*, 2008; GABAY & MCLMMES, 2009).

Embora os resultados obtidos não possam ser correlacionados a estudos *in vivo* utilizando essas superfícies, a interação entre mononucleares e células osteogênicas, assim como a

interação dessas células com as superfícies avaliadas, provavelmente modificou a resposta, uma vez que os mediadores liberados pelos mononucleares agem sobre as células osteogênicas e vice-versa (DAVIES, 2000), influenciando o processo de neo-osteogênese. Além disso, uma mesma citocina pode apresentar múltiplos efeitos funcionais (pleiotropismo) e também efeitos em comum com outras citocinas (redundância), formando uma intrincada rede de comunicação celular.

8. Conclusões

Diante dos resultados obtidos pelo presente estudo pode-se concluir que:

1 – O tipo de superfície analisada não interferiu na viabilidade celular. No entanto, a adesão das células osteogênicas variou em função da superfície e do tempo.

2 – Apenas a superfície S1 induziu modificações na morfologia das células mononucleares. Contudo, nas células osteogênicas e na cocultura, a morfologia variou em função do tempo e das superfícies nas quais as células foram cultivadas. No grupo S1 as células alinharam-se com as ranhuras do disco, enquanto nos grupos S2 e S3 apresentaram-se mais espaiadas, sobretudo em 7 dias.

3 – A superfície S3 influenciou a produção de osteopontina pelas células osteogênicas. A detecção de fosfatase alcalina foi dependente da superfície e do tempo, tanto em células osteogênicas quanto na cocultura. Em 7 dias o Grupo S2 apresentou maior porcentagem de células positivas para ALP nas duas modalidades de cultura. Já aos 14 dias, o grupo S3 apresentou maior porcentagem de células positivas para ALP na cocultura, embora na cultura de células osteogênicas não tenha sido detectada diferença estatística significativa entre as superfícies.

4 – O perfil da produção de citocinas analisadas não seguiu um padrão em função das superfícies nas quais as células foram cultivadas. No entanto, a interação celular (cocultura) sobre essas superfícies pareceu modular a resposta, sugerindo que ambas são importantes na avaliação do processo de osteogênese *in vitro*.

9. Referências bibliográficas

- AHSAN, T.; NEREM, R. M. Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry. **Orthod Craniofacial Res.**, v. 8, n. 3, p. 34-140, Aug 2005.
- AKINTOYE, S.O.; LAM, T.; SHI, S.; BRAHIM, J.; COLLINS, M.T.; ROBEY, P.G. Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. **Bone**, v. 38, n. 6, p.758-68, Jun 2006.
- AKINTOYE, S.O.; GIAVIS, P.; STEFANIK, D.; LEVIN, L.; MANTE, F.K. Comparative osteogenesis of maxilla and iliac crest human bone marrow stromal cells attached to oxidized titanium: a pilot study. **Clin Oral Implants Res.**, v. 19, n. 11, p.1197-201, Nov 2008.
- ALBREKTSSON, T. Osseointegração antecedentes históricos e conceitos atuais. In: LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap. 28, p. 623-630.
- AMARANTE, E. S.; LIMA, L. A. de. Otimização das superfícies dos implantes: plasma de titânio e jateamento com areia condicionado por ácido – estado atual. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 2, p. 166-173, abr./jun. 2001.
- ANDRADES, J.A.; SANTAMARÍA, J.A.; NIMNI, M.E.; BECERRA, J. Selection, amplification, induction and differentiation of osteoprogenitor cells: an alternative for bone repair. **Mapfre Medicina**, v. 10, p. 190-201, 1998.
- AUBIN, J.E. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. **J Cell biochem.**, v. 72, n. 3, p. 396-410, Mar 1999.
- BACHEL, M.; KOHAL, R. J. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, deifferetiation on protein syntthesis of osteoblast-like MG63 cells. **Clin Oral Impl Res.**, v. 15, n. 6, p. 683-692, Dec 2004.
- BAKSH, D.; DAVIES, J.E.; ZANDSTRA, P.W. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells capable of adhesion-independent survival and expansion. **Exp Hematol.**, v. 31, n. 8, p. 723-32, Aug 2003.
- BELOTI, M.M.; ROSA, A.L. Osteoblast differentiation of human bone cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. **Braz Dent J.**, v. 16, n. 2, p. 156-161, 2005.

- BI, Y.; LIU, G.; YANG, R. Th17 cell induction and immune regulatory effects. **J. Cell Physiol.**, v. 211, p. 273-278, 2007.
- BOYAN, B.D.; LOSSDÖRFER, S.; WANG, L., ZHAO, G.; LOHMANN, C.H.; COCHRAN, D.L.; SCHWARTZ, Z. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. **Eur Cell Mater.**, v. 24, n. 6, p. 22-27, Oct 2003.
- BRUNETTE, D.M.; CHEHROUDI, B. The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behaviour *in vitro* and *in vivo*. **J Biomech Eng.**, v. 121, n.1, p.49-57, Feb 1999.
- CHAMPAGNE, C.M.; TAKEBE, J.; OFFENBACHER, S.; COOPER, L.F. Macrophage cells lines produces osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. **Bone.**, v. 30, n. 1, p. 26-31, Jan 2002.
- CIAPETTI, G.; GONZÁLEZ-CARRASCO, J.L.; SAVARINO, L.; MONTEALEGRE, M.A.; PAGANI, S.; BALDINI, N. Quantitative assessment of the response of osteoblast-and macrophage like cells to particles of Ni-free Fe-base alloys. **Biomaterials.**, v. 26, n.8, p. 849-59, Mar 2005.
- CLAUSEN, C.; HERMUND, N.U.; DONATSKY, O.; NIELSEN, H.; OSTHER, K. Homologous activated platelets stimulate differentiation and proliferation of primary human bone cells. **Cells Tissues Organs.**, v. 184, n. 2, p. 68-75, 2006.
- COELHO, P.G.; LEMONS, J.E. Physico/chemical characterization and in vivo evaluation of nanothickness bioceramic depositions on alumina-blasted/acid-etched Ti-6Al-4V implant surfaces. **J Biomed Mater Res A.**, v. 90, n. 2, p. 351-61, Aug 2009.
- COELHO, P.G.; GRANJEIRO, J.M.; ROMANOS, G.E.; SUZUKI, M.; SILVA, N.R.; CARDAROPOLI, G.; THOMPSON, V.P.; LEMONS, J.E. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v. 88, n. 2, p. 579-96, Feb 2009 A.
- COELHO, P.G.; SUZUKI, M.; GUIMARAES, M.V.; MARIN, C.; GRANATO, R.; GIL, J.N.; MILLER, R.J. Early Bone Healing around Different Implant Bulk Designs and Surgical Techniques: A Study in Dogs. **Clin Implant Dent Relat Res.**, [Epub ahead of print] May 2009.

- CURRAN, J.M.; GALLAGHER, J.A.; HUNT, J.A. The inflammatory potential of biphasic phosphate granules in osteoblast/macrophage co-culture. **Biomaterials.**, v. 26, n.26, p. 5313-20, Sep 2005.
- DALLE CARBONARE, L.; VALENTI, M.T.; BERTOLDO, F.; ZANATTA, M.; ZENARI, S.; REALDI, G.; LO CASCIO, V.; GIANNINI, S. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. **Micron.**, v. 36, n. 7-8, p. 609-16, 2005.
- DAVIES, J.E. **Bone Engineering**. Toronto: em squared Inc., 2000.
- DAVIES, J.E. Understanding peri-implant endosseous healing. **J Dental Educ.**, v. 67, n. 8, p. 932-947, Aug 2003. Review.
- DE OLIVEIRA, P.T.; ZALZAL, S.F.; IRIE, K.; NANCI, A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. **J Histochem Cytochem.**, v. 51, n. 5, p. 633-41, May 2003.
- DE OLIVEIRA, P.T.; NANCI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials.**, v. 25, n. 3, p. 403-13., Fev 2004.
- DE OLIVEIRA, P.T.; ZALZAL, S. F.; Beloti, M.M .; ROSA, A.L.; NANCI, A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A.**, v. 80A, p. 554-564., 2007.
- DECLERCQ, H.A.; VERBEECK, R.M.; DE RIDDER, L.I.; SCHACHT, E.H.; CORNELISSEN, M.J. Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. **Biomaterials.**, v. 26, n. 24, p. 4964-74, Ago 2005.
- ERGUN, C.; LIU, H.; WEBSTER, T.J. Osteoblast adhesion on novel machinable calcium phosphate/lanthanum phosphate composites for orthopedic applications. **J Biomed Mater Res A.**, v. 89, n. 3, p. 727-33, Jun 2009.
- FRANCHI, M.; FINI, M.; MARTINI, D.; ORSINI, E.; LEONARDI, L.; RUGGERI, A.; GIAVARESI, G.; OTTANI, V. Biological fixation of endosseous implants. **Micron**, v. 36, n. 7-8, p. 665-71, 2005.
- FRANCHIMONT, N.; WERTZ, S.; MALAISE, M. Interleukine-6. An osteotropic factor influencing bone formation? **Bone**, v. 37, n. 5, p. 601-6, Nov 2005.
- GABAY, C.; MCINNES, I.B. The biological and clinical importance of the 'new generation' cytokines in rheumatic diseases. **Arthritis Res Ther.** v. 19, n. 3, p. 230, May 2009.

- GARCÍA-LÓPEZ, S.; MEIKLE, M.C.; VILLANUEVA, R.E.; MONTAÑO, L.; MASSÓ, F.; RAMÍREZ-AMADOR, V.; BOJALIL, R. Mechanical deformation inhibits IL-10 and stimulates IL-12 production by mouse calvarial osteoblasts *in vitro*. **Arch Oral Biol.**, v. 50, n. 4, p. 449-52, Apr 2005.
- GRETZER, C.; GISSELFÄLT, K.; LILJENSTEN, E.; RYDÉN, L.; THOMSEN, P. Adhesion, apoptosis and cytokine release of human mononuclear cells cultured on degradable poly (urethane urea), polystyrene and titanium *in vitro*. **Biomaterials**, v. 24, n. 17, p. 2843-2852, Ago 2003.
- HENG, B.C.; CAO, T.; STANTON, L.W.; ROBSON, P.; OLSEN, B. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage *in vitro*. **J Bone Miner Res.**, v. 19, n. 9, p. 1379-94, Sep 2004.
- HOROWITZ, S.M.; GONZALES, J.B. Inflammatory response to implant particulates in a macrophage/osteoblast coculture model. **Calcif Tissue Int.**, v. 59, n. 5, p. 392-6, Nov 1996.
- HUGHES, F.J.; TURNER, W.; BELIBASAKIS, G.; MARTUSCELLI, G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. **Periodontol 2000.**, v. 41, p.48-72, 2006.
- HUNT, T.K. Basic principles of wound healing. **J Trauma.**, v. 30, n. 12 Suppl, p. 122-128, Dec 1990.
- KANAAN, R.A.; KANAAN, L.A. Transforming growth factor beta1, bone connection. **Med Sci Monit.** 12(8):RA164-9, Ago 2006.
- KAWAGUCHI, M.; ADACHI, M.; ODA, N.; KOKUBU, F.; HUANG, S.K. IL-17 cytokine family. **J Allergy Clin Immunol.** v. 14, n. 6, p.1265-73, Dec 2004.
- KISHIDA, A.; KATO, S.; OHMURA, K.; SUGIMURA, K.; AKASHI, M. Evaluation of biological responses to polymeric biomaterials by RT-PCR analysis. I. Study of IL-1 beta mRNA expression. **Biomaterials**, v. 17, n. 13, p. 1301-5, Jul 1996.
- KOLLS, J.K.; LINDÉN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity.**, v. 21, n. 4, p.467-76, Oct 2004.
- LEMONS JE. Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants. **J Oral Implantol.**, v. 30, n. 5, p.318-24, 2004.
- LI, L.H.; KONG, Y.M.; KIM, H.W.; KIM, Y.W.; KIM, H.E.; HEO, S.J; KOAK, J.Y. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. **Biomaterials**, v. 25, n. 14, p. 2867-75, Jun 2004.

- LIU, H.; YAZICI, H.; ERGUN, C.; WEBSTER, T.J.; BERMEK, H. An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration. **Acta Biomater.** v. 4, n. 5, p.1472-9, Sep 2008.
- LINCKS, J.; BOYAN, B.D.; BLANCHARD, C.R.; LOHMANN, C.H.; LIU, Y.; COCHRAN, D.L.; DEAN, D.D.; SCHWARTZ, Z. Response of MG63 osteoblast like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. **Biomaterials**, v. 19, n. 23, p. 2219-32, Dec 1998.
- MARCO, F.; MILENA, F.; GIANLUCA, G.; VITTORIA, O. Peri-Implant osteogenesis in health and osteoporosis. **Micron**, v. 36, n. 7-8, p. 630-644, 2005.
- MUSTAFA, K.; WENNERBERG, A.; WROBLEWSKI, J.; HULTENBY, K.; LOPEZ, B.S.; ARVIDSON, K. Determining optimal surface roughness of TiO(2) blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. **Clin Oral Implants Res.**, v. 12, n. 5, p.515-25, Oct 2001.
- MÜLLER, P.; BULNHEIM, U.; DIENER, A.; LÜTHEN, F.; TELLER, M.; KLINKENBERG, E.D.; NEUMANN, H.G.; NEBE, B.; LIEBOLD, A.; STEINHOFF, G.; RYCHLY, J. Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **J Cell Mol Med.** v. 12, n. 1, p.281-91, 2008.
- OREFFO, R.O.; BORD, S.; TRIFFITT, J.T. Skeletal progenitors cells and ageing human populations. **Clin Sci (Lond)**, v. 94, n. 5, p. 549-55, May 1998.
- OWEN, M.E. **Marrow stromal stem cells in culture.** Cambridge, England: Cambridge University, p. 88-10, 1998.
- PARK, J.Y.; DAVIES, J.E. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. **Clin Oral Implants Res.**, v. 11, n. 6, p. 530-9, Dec 2000.
- PERINPANAYAGAM, H.; MARTIN, T.; MITHAL, V.; DAHMAN, M.; MARZEC, N.; LAMPASSO, J.; DZIAK, R. Alveolar bone osteoblast differentiation and Runx2/Cbfa1 expression. **Arch Oral Biol.**, v. 51, n. 5, p. 406-15, May 2006.
- PINKERTON, M.N.; WESCOTT, D.C.; GAFFEY, B.J.; BEGGS, K.T.; MILNE, T.J.; MEIKLE, M.C. Cultured human periodontal ligament cells constitutively express multiple osteotropic cytokines and growth factors, several of which are responsive to mechanical deformation. **J Periodontal Res.** v. 43, n. 3, p. 343-51, jun 2008.
- POPAT, K.C.; LEONI, L.; GRIMES, C.A.; DESAI, T.A. Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells. **Biomaterials.**, v. 28, n. 21, p.3188-97, Jul 2007.

- PUELO, D.A.; NANCI, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. **Biomaterials**, v. 20, n. 23-24, p. 2311-21, Dec 1999.
- RAUSCH-FAN, X.; QU, Z.; WIELAND, M.; MATEJKA, M.; SCHEDULE, A. Differentiation and cytokine synthesis of human alveolar osteoblasts compared to osteoblast-like cells (MG63) in response to titanium surfaces. **Dent Mater.** v. 24, n. 1, p. 102-110, Jan 2008.
- REFAI, A.K.; TEXTOR, M.; BRUNETTE, D.M.; WATERFIELD, J.D. Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. **J Biomed Mater Res A.**, v. 70, n. 2, p. 194-205, Aug 2004.
- REYES-BOTELLA, C.; MONTES, M.J.; VALLECILLO-CAPILLA, M.F.; OLIVARES, E.G.; RUIZ, C. Antigenic Phenotype of cultured human osteoblast –like cells. **Cell Physiol Biochem.**, v. 12, n. 5-6, p. 359-64, 2002.
- RESSETTI, A. P. A.; BUCHI, D. F. **Ação in vitro do medicamento homeopático canova em medula óssea de camundongos.** Dissertação (mestrado), Universidade Federal do Paraná, 2005.
- RICE, J.M.; HUNT, J.A.; GALLAGHER, J.A.; HANARP, P.; SUTHERLAND, D.S.; GOLD, J. Quantitative assessment of the response of primary derived osteoblasts and macrophages to a range of nanotopography surfaces in a single culture model in vitro. **Biomaterials**, v. 24, n. 26, p. 4799-818, Nov 2003.
- ROSA, A.L.; BELOTI, M.M. Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. **Braz Dent J**, v. 14, n. 1, p. 16-21, 2003.
- ROSA, A.L.; CRIPPA, G.E.; DE OLIVEIRA, P.T.; TABA, M. J.R.; LEFEBVRE, L.P.; BELOTI, M.M. Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. **Clin Oral Implants Res.**, v. 20, n. 5, p.472-81, May 2009.
- SALTHOUSE, T.N. Some aspects of macrophage behavior at the implant interface. **J Biomed Mater Res.**, v. 18, n. 4, p. 395-401, Apr 1984.
- SATO, M., WEBSTER, T.J. Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications. **Expert Rev Med Devices.**, v. 1, n.1, p.105-114, Sep 2004.
- SCHMIDT, C.; STEINBACH, G.; DECKING, R.; CLAES, L.E.; IGNATIUS, A.A. IL6 and PGE₂ release by human osteoblasts on implant materials. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4191-6, Oct 2003.

- SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B.D. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. **J Cell Biochem.**, v. 56, n. 3, p. 340-7, Nov 1994.
- SELA, M.N.; BADIHI, L.; ROSEN, G.; STEINBERG, D.; KOHAVI, D. Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces. **Clin Oral Implants Res.**, v. 18, n. 5, p. 630-8, Oct 2007.
- SHEN, F.; RUDDY, M.J.; PLAMONDON, P.; GAFFEN, S.L. Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF-alpha-induced genes in bone cells. **J Leukoc Biol.** v. 77, n. 3, p.388-99, mar 2005.
- SILVA, S.N.; PEREIRA, M.M.; GOES, A.M.; LEITE, M.F. Effect of biphasic calcium phosphate on human macrophage functions in vitro. **J Biomed Mater Res A.** v. 65, n. 4, p.475-81, Jun 2003.
- SIMON, Z.; WASTON, P.A. Biomimetic dental implants-news ways to enhance osseointegration. **J Can Dent Assoc.**, v. 68, n. 5, p. 286-8, May 2002.
- SOSKOLNE, W.A.; COHEN, S.; SENNERBY, L.; WENNERBERG, A.; SHAPIRA, L. The effect of titanium surface roughness on adhesion of monocytes and their secretion of TNF α and PGE $_2$. **Clin Oral Impl Res.**, v. 13, n. 1, p. 86-93, Feb 2002.
- SPYROU, P.; PAPAIOANNOU, S.; HAMPSON, G.; BRADY, K.; PALMER, R.M.; MCDONALD, F. Cytokine release by osteoblast-like cells cultures on implant discs of varying alloy compositions. **Clin Oral Impl Res.**, v. 13, n. 6, p. 623-630, Dec 2002.
- TSUTSUI, T.; KAWAGUCHI, H.; FUJINO, A.; SAKAI, A.; KAJI, H.; NAKAMURA, T. Exposure of macrophage like cells to titanium particles does not affect bone resorption, but inhibits bone formation. **J Orthop Sci.**, v. 4, n. 1, p.32-38, 1999.
- TZAPHLIDOU, M. The role of collagen in bone structure: an image processing approach. **Micron**, v. 36, n. 7-8, p. 593-601, 2005.
- UDAGAWA, N.; KOTAKE, S.; KAMATANI, N.; TAKAHASHI, N.; SUDA, T. The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res.**, v. 4, n. 5, p.281-9, 2002.
- VALLÉS, G.; GIL-GARAY, E.; MUNUERA, L.; VILABOA, N. Modulation of the cross-talk between macrophages and osteoblasts by titanium-based particles. **Biomaterials.**, v. 29, n. 15, p. 2326-35, May 2008.

- WANG, J.Y.; WICKLUND, B.H.; GUSTILO, R.B.; TSUKAYAMA, D.T. Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokines by human monocytes/macrophages in vitro. **Biomaterials**, v. 17, n. 23, p. 2233-40, Dec 1996.
- WATZEK, G. **Implants in qualitatively compromised bone**. Quintessence Publishing Co, Inc. São Paulo, p. 181, 2004.
- XAVIER, S.P.; CARVALHO, P.S.; BELOTI, M.M.; ROSA, A.L. Response of Rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. **J Dent.**, v. 31, n. 3, p. 173-80, Mar 2003.
- XIE, Y.; LIU, X.; HUANG, A.; DING, C.; CHU, P.K. Improvement of surface bioactivity on titanium by water and hydrogen plasma immersion ion implantation. **Biomaterials**, v. 26, n. 31, n. 6129-6135, Nov 2005.
- YAMADA, M.; SUZU, S.; TANAKA-DOUZONO, M.; WAKIMOTO, N.; HATAKE, K.; HAYASAWA, H.; MOTOYOSHI, K. Effect of cytokines on the proliferation/differentiation of stroma-initiating cells. **J Cell Physiol.**, v. 184, n. 3, p. 351-355, Sep 2000.
- YAO, C.; PERLA, V.; MCKENZIE, J. L.; SLAMOVICH, E. B.; WEBSTER, T. J. Anodized Ti and TiAl4V possessing nanometer surface features enhances osteoblast adhesion. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 1, n. 1, p. 68-73, Mar 2005.
- YOUNG, M.F. Bone matrix proteins: their function, regulation, and their relationship to osteoporosis. **Osteoporos Int.**, v. 14, n. 3, p. 35-42, 2003.
- YU, J.J.; RUDDY, M.J.; WONG, G.C.; SFINTESCU, C.; BAKER, P.J.; SMITH, J.B.; EVANS, R.T.; GAFFEN, S.L. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. **Blood**. v. 109, n. 9, p.3794-802, May 2007.
- ZAFFE, D. Some considerations on biomaterials and bone. **Micron**, v. 36, n. 7-8, p. 583-92, 2005.
- ZARB, G.; LEKHOLM, U.; ALBREKTSSON, T.; TENENBAUM, H. **Aging, osteoporosis and dental implants**. Quintessence Publishing Co, Inc. São Paulo, p. 260, 2002.
- ZINGER, O.; ANSELME, K.; DENZER, A.; HABERSETZER, P.; WIELAND, M.; JEANFILS, J.; HARDOUIN, P.; LANDOLT, D. Time-dependent adhesion and morphology of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-dependent topography. **Biomaterials**, v. 25, n. 14, p. 2695-711, Jun 2004.

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



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 046/06

Registro CEP: 004/06

Projeto Pesquisa: "Influência das citocinas IL1 e TGFβ em culturas de osteoblastos humanos, e na osseointegração"

Pesquisadores Responsáveis: Paula Dechichi

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.

Data para entrega do **Relatório Final: abril/2008**

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

Uberlândia, 08 de março de 2006.


 Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
 Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cidadão (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto no sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.c). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.

Carta de consentimento livre e esclarecido

A pesquisa, **Influência das citocinas IL1 e TGF β em culturas de osteoblastos humanos, e na osseointegração**, será realizada na Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação da Professora Doutora Paula Dechichi, não possuindo fins lucrativos. Para que a mesma possa ser realizada é necessário que seja doado um fragmento ósseo obtido no momento da instalação do implante e 40 ml de sangue.

Se for de seu interesse, livre e espontânea vontade, contribuir com este estudo, no qual sua identidade será preservada, não terá prejuízo financeiro, físico ou moral, e do qual poderá se retirar no momento em que desejar, vossa senhoria deverá preencher os campos abaixo.

Eu _____, portador de RG _____, aceito por livre e espontânea vontade participar desse estudo, estando ciente de que não serei beneficiado financeiramente, e nem tampouco serei prejudicado pelo mesmo, que possui apenas fins científicos. Poderei me retirar dessa pesquisa no momento em que desejar, sendo minha identidade preservada.

Assinatura do paciente:

Assinatura da coordenadora do projeto:

Telefone para contato: 34-32182240

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia - Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Campus Santa Mônica - bloco J. Fone 3239-4131/32394531