

Natássia Cristina Martins Oliveira

Efeito da anodização com CaP em superfícies de titânio sobre a resposta de osteoblastos

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia na Área de Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia, 2012

Natássia Cristina Martins Oliveira

Efeito da anodização com CaP em superfícies de titânio sobre a resposta de osteoblastos

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia na Área de Clínica Odontológica Integrada.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Dechichi

Coorientadora: Profa. Dra. Camilla Christian Gomes Moura

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza

Profa. Dra. Paula Dechichi

Prof. Dra. Virgínia Oliveira Crema

Uberlândia

2012

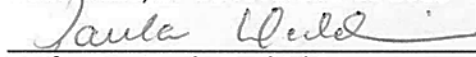


SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

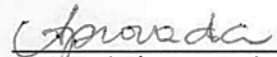
ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA **222ª DEFESA** DE MESTRADO DO (A) **CD NATÁSSIA CRISTINA MARTINS OLIVEIRA** DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

Às nove horas do dia **vinte e sete de fevereiro do ano de dois mil e doze**, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento da Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno (a) **NATÁSSIA CRISTINA MARTINS OLIVEIRA** com o **título: "Efeito da anodização com CaP em superfícies de titânio sobre resposta de osteoblastos"**. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de Dissertações e Teses da Biblioteca desta Universidade. Acompanham este relatório os pareceres individuais dos membros da Comissão Julgadora. Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às **13** horas e **00** minutos. Foi lavrada á presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.


Uberlândia, 27 de fevereiro de 2012



Profa. Dra. Paula Dechichi
Titulação: Doutora
Universidade Federal de Uberlândia – UFU



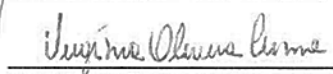
Aprovado/Reprovado



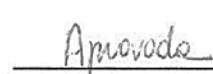
Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza
Titulação: Doutora
Universidade Federal de Uberlândia - UFU



Aprovado/Reprovado



Profa. Dra. Virginia Oliveira Crema
Titulação: Doutora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Aprovado/Reprovado

DEDICATÓRIA

À **Deus**, pela vida e pela saúde e especialmente por me permitir estar hoje com meu pai saudável.

Aos meus pais **Raimundo** e **Abadia**, que sempre me apoiaram, incentivaram e se sacrificaram para que eu me formasse, muitas vezes abdicando de seus próprios sonhos para tornar os meus realidade. Amo vocês!

Às minhas irmãs **Andreia** e **Nívea**, que sempre acreditaram no meu potencial e investiram em mim. Afinal de contas, o que seria do meu colegial sem você Andreia? E o que seria de mim nos Estados Unidos sem o apoio do meu cunhado **Fábio** e, principalmente, sem o seu apoio Nívea? Obrigada por tudo que já fizeram por mim, por todo incentivo e pela sincera amizade que temos construído. Eu as amo demais.

Não poderia esquecer de dedicar este trabalho à nossa princesinha **Nicole**. Uma sobrinha linda e inteligente que Deus colocou nas nossas vidas e que tantas vezes me chamava pra brincar de “UFA” (na verdade brincar de estudar na UFU). Quanto orgulho tenho de você pequena! A tia ama tanto.

E por último, mas não menos importante, dedico essa conquista ao meu companheiro, cúmplice e amor, **Wanderson Lima**. Sem você minha batalha teria sido bem mais árdua. Você trouxe luz e inspiração para meus projetos pessoais e profissionais, me vendo crescer e crescendo junto comigo. Devo parte desta conquista a você. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Paula Dechichi**, pela orientação e os ensinamentos que foram fundamentais para meu crescimento profissional e, principalmente, pessoal. Obrigada pela confiança incondicional depositada em meu nome, pelas cobranças diárias e, acima de tudo, pela amizade sincera e o carinho com que sempre me tratou, servindo muitas vezes como uma segunda “mãe” para mim. Nesses dois anos, você se tornou uma grande referência, tanto na docência quanto na ética, humildade e honestidade sem igual que conduz seus projetos e sua vida.

À **Prof. Dra. Camilla Moura**, por me iniciar na pesquisa com Biologia Celular e Biomateriais, área pela qual me apaixonei, me oportunizando inclusive a experiência de dar aula na pós. Obrigada também pelo esforço em conjunto para que eu pudesse fazer o estágio fora e pela empolgação contagiante que falava de seus projetos. Saiba que mesmo os momentos difíceis que tivemos serviram de aprendizado para a vida. Com certeza, somos pessoas melhores.

Ao **Prof. Dr. Carlos José Soares**, pela oportunidade de realizar meu grande sonho profissional: estudar em uma grande universidade nos Estados Unidos. Graças à sua presteza e confiança, pude realizar um estágio na Universidade de Minnesota ao lado de pesquisadores magníficos. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Conrado Aparicio**, meu orientador na Universidade de Minnesota, por me aceitar como orientada e me acolher em seu laboratório de braços abertos sem ao menos me conhecer. Você me mostrou como fazer pesquisa e como agir enquanto pesquisador, sem deixar de lado o tratamento pessoal que dispensa à sua equipe. Com certeza, se tornou um grande

exemplo de profissional para mim, meu espelho de como quero trilhar meu caminho.

Ao **Minnesota Dental Research Center for Biomaterials and Biomechanics (MDRCBB)**, na pessoa do **Prof. Dr. Alex Fok** e da **Profa. Dra. Maria Pintado**, pela recepção, acolhimento e atenção dispensados a mim diariamente. À todos os amigos que fiz no departamento que muito contribuíram para tornar meus dias longe de casa mais amenos e divertidos, em especial a **Xi Chen**, **Yupin Li**, **Jeevan Prasaad**, **Young Heo**, **Jianying Li**, **Haiyan Li** e **Marilynn Erickson**.

A todos do **Laboratório de Biomateriais e Biomimetismo Celular (LABIOCEL)**, em especial aos mais próximos de minha convivência diária: meu também companheiro de mestrado **Danilo Maldonado** sempre bem-humorado; minhas orientadas de iniciação científica **Fernanda Faria**, **Silvana Lima** e **Beatriz Paiva** com as quais ri, chorei e compartilhei um pouco de minha vida tantas vezes; e aos demais, **Rainde**, **Larissa**, **Huberth**, **Fabiana**, **Hanny**, **Mariana** e **Flaviana** pelas inúmeras risadas com o gelo seco e as festinhas de aniversário.

Ao pessoal da **Histologia**, em especial à **Prof. Dra. Karen Hiraki** e ao **Prof. Marcelo Beletti** sempre muito atenciosos, à **Ester** que esterilizava nosso material, à **Bellisa** e à **Angélica** que vez ou outra nos ajudavam com as dúvidas de cultura, ao **Fabício** e seu bom-humor contagiante, à **Mariani** que sofria junto comigo no Confocal me dando força sempre e à **Jucélia** pela presteza na secretaria.

Ao **Laboratório de Tripanossomatídeos (LATRI)**, na pessoa do **Prof. Dr. Cláudio Vieira** e dos pesquisadores **Adele, Fabrício e Fernanda Shoyama** pela enorme ajuda nos salvando na falta de algum material ou mesmo compartilhando ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Gustavo Mendonça** e sua esposa **Profa. Dra. Daniela Mendonça**, da Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill, pela enorme ajuda e contribuição na análise da expressão gênica, sem as quais teria sido impossível a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Paulo Cézar Simamoto Júnior** e a **Profa. Dra. Veridiana Resende Novaes Simamoto**, por terem me ensinado a dar os primeiros passos na pesquisa quando me orientaram na iniciação científica.

Ao meu colega de mestrado **Rodrigo**, vulgo Jaíba, pelas discussões enriquecedoras para a análise estatística deste trabalho.

A todos os meus amigos contemporâneos de mestrado, em especial **Josemar, Ana Paula, Danilo, Sara, Mário, Éverton e Rodrigo**, por tornarem a rotina cansativa de aulas e seminários bem mais divertida.

Às amigas verdadeiras que fiz durante a graduação e que tanto me apoiaram para seguir a área acadêmica e prestar o mestrado: **Paula Caetano, Ana Paula Viadanna, Paulo Diêgo e Naila Machado**. Obrigada por fazerem parte de minha vida em um momento tão importante.

Aos meus queridos e eternos amigos Planaltino's (vocês vão entender), especialmente às amigas para todas as horas (inclusive para organizar as referências) **Renata Cristina** e **Daiane Almeida**, que tiveram uma enorme contribuição me dando forças para terminar a dissertação em um momento difícil de minha vida. Sem esquecer da minha mentora **Cléo Geovanini**, que lá no ensino fundamental já nos motivava e inspirava a querer ir além em busca do conhecimento. Obrigada meninas! Eu amo vocês.

EPÍGRAFE

*“Há um tempo em que é preciso abandonar
as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo,
e esquecer os nossos caminhos,
que nos levam sempre aos mesmos lugares.
É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la,
teremos ficado, para sempre, às margens de nós mesmos.”*

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Diferenciação osteogênica	21
2.2 Biologia da osseointegração	24
2.3 Titânio como material de implante	26
2.4 Modificações de superfície do titânio	27
2.5 Modificações físicas de superfície	28
2.6 Modificações químicas de superfície	31
2.7 Osteogênese <i>in vitro</i>	35
3. PROPOSIÇÃO.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Obtenção e caracterização das superfícies de titânio	41
4.2 Cultura de células	42
4.3 Determinação da viabilidade celular	43
4.4 Análise da expressão gênica	44
4.5 Dosagem dos fatores de crescimento	47
4.6 Análise estatística	49
5. RESULTADOS.....	50
5.1 Viabilidade celular	51
5.2 Análise da expressão gênica	51
5.3 Dosagem dos fatores de crescimento	53
5.4 Associação entre fatores de crescimento vs. <i>Runx2</i> e entre <i>Runx2</i> vs. <i>ALP/BSP</i>	55
6. DISCUSSÃO.....	57
7. CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2 Azino-bis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico]
ALP	Fosfatase Alcalina
Al₂O₃	Alumina
ANOVA	Análise de Variância
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collection
BMP-2	Proteína Morfogenética Óssea 2
BSP	Sialoproteína Óssea
Ca²⁺	Íons cálcio
CaP	Cálcio Fosfato
Cbfa-1	Core-binding factor alpha 1
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CO₂	Dióxido de carbono
Ct	Valor do ciclo limiar
DAFI	Deposição Assistida de Feixe Iônico
DCD	Deposição Cristalina Discreta
DEPC	Água de dietilpirocarbonato
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
h	Hora
HA	Hidroxiapatita

H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
hFOB	Human Fetal Osteoblastic cells
hMSCs	Células tronco-mesenquimais humanas
HNO₃	Ácido Nítrico
HPO₄²⁻	Íons fosfato hidratado
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide
N	Normal
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
°C	Graus Celsius
OCN	Osteocalcina
OH	Hidroxila
OPN	Osteopontina
OSX	Osterix
P	Fósforo
p	Probabilidade
PBS	Solução Salina Tamponada
PBS-T	Solução Salina Tamponada + Tween 20
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PSHA	Plasma Spray de Hidroxiapatita
r	Coeficiente de correlação de Pearson
Ra	Média aritmética da altura dos picos
RBM	Biocerâmica reabsorvível

RNA	Ácido Ribonucléico
RNA_m	Ácido Ribonucléico mensageiro
RNase	Enzima Ribonuclease
ROB-C26	Linhagem de células osteoprogenitoras C26
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real
Runx2	Runt-related transcription factor 2
SLA	Superfície jateada com sílica e modificada por ácido
TGF-β1	Fator de Crescimento Transformador β1
Ti	Titânio
Ti cp	Titânio comercialmente puro
TiO₂	Dióxido de titânio
Ti-6Al-4V	Liga de titânio com 4% de alumínio e 6% de vanádio
TMB	Tetrametilbenzina
UV	Ultravioleta
ΔCt	Variação do valor do ciclo limiar
ΔΔCt	Variação do valor de ΔCt calculado
%	Por cento
®	Marca Registrada
°	Graus
>	Maior
μL	Microlitros
μm	Micrômetros
2^{-ΔΔCt}	Método Limiar Crítico Comparativo

Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar a influência da anodização com incorporação de CaP em superfícies de titânio no processo de osteogênese *in vitro*. Para tanto, osteoblastos humanos da linhagem hFOB 1.19 foram plaqueados sobre discos de titânio comercialmente puro (8x4 mm) com três tratamentos de superfície (n=21 discos/grupo): usinado (Screw[®]), ataque ácido (Porous[®]) e anodizado com incorporação de CaP (Vulcano[®]). Após 3, 7 e 14 dias de cultura, os seguintes parâmetros foram avaliados: viabilidade celular (MTT); expressão dos genes *Runx2*, fosfatase alcalina (*ALP*) e sialoproteína óssea (*BSP*) (RT-PCR em tempo real); e dosagem dos fatores de crescimento BMP-2 e TGF- β 1 (ELISA). A associação entre a secreção de fatores de crescimento e a expressão de *Runx2*, bem como entre a expressão deste fator de transcrição com a expressão de *ALP/BSP* também foi avaliada. Os resultados referentes à viabilidade celular mostraram um maior número de células viáveis para as superfícies rugosas, especialmente para Porous e Vulcano aos 7 dias ($p=0,005$) e para Porous aos 14 dias ($p<0,001$). A expressão dos genes *Runx2*, *ALP* e *BSP* foi significativa para todas as superfícies aos 7 dias ($p<0,05$), mas com maior indução para Porous e Vulcano. Independente do tipo de superfície, uma forte correlação positiva foi observada entre as expressões de *Runx2* e *ALP/BSP* ($p<0,0001$). A secreção dos fatores de crescimento não foi significativamente afetada pelo tratamento de superfície em nenhum tempo experimental ($p>0,05$). Vulcano modulou significativamente a correlação entre a secreção de TGF- β 1 e a expressão de *Runx2* ($p<0,05$), o que não ocorreu para BMP-2 nem para as outras superfícies avaliadas. A incorporação de CaP favoreceu os parâmetros biológicos avaliados no período de 7 dias, mas de maneira similar às superfícies que sofreram apenas ataque ácido. Os resultados do presente estudo suportam as observações de que a rugosidade pode ter um papel mais importante na determinação da resposta celular do que a composição da superfície.

Palavras-chave: Osteoblastos; Superfícies de implante; Expressão gênica; Fatores de crescimento; Osseointegração.

Abstract

The aim of this study was to investigate the influence of anodization with CaP incorporation on titanium surfaces in the process of osteogenesis *in vitro*. For this, human fetal osteoblasts (hFOB 1.19) were seeded over commercially pure titanium disks (8x4 mm) with three surface treatments (n= 21 disks/group): machined (Screw[®]), acid etching (Porous[®]) and anodized with calcium phosphate (CaP) incorporation (Vulcano[®]). After 3, 7 and 14 days of culture, the following parameters were evaluated: cell viability (MTT); gene expression of *Runx2*, alkaline phosphatase (*ALP*) and bone sialoprotein (*BSP*) (Real time RT-PCR); and quantification of BMP-2 e TGF- β 1 (ELISA). The association between growth factors secretion and *Runx2* expression, as well as between this transcription factor with *ALP/BSP* expressions was also evaluated. Results concerning cell viability showed a greater number of viable cells for rough surfaces, especially for Porous and Vulcano at 7 days ($p=0.005$) and for Porous at 14 days ($p<0.001$). There were significant differences regarding gene expression of *Runx2*, *ALP* and *BSP* for all surfaces at 7 days ($p<0.05$), but with greater fold induction for Porous and Vulcano. Regardless of the surface treatment, a strong positive correlation was observed between *Runx2* and *ALP/BSP* expressions ($p<0.0001$). Growth factors secretion was not significantly affected by surface treatment in any experimental period ($p> 0.05$). Vulcano modulated significantly the correlation between the TGF- β 1 secretion and *Runx2* expression ($p<0.05$), which did not happen for BMP-2 or for other surfaces studied. The CaP incorporation favored the biological parameters evaluated at 7 days, but in a manner similar to the acid etched surfaces. The results presented here support the observations that surface roughness may play a more important role in determining cellular response than surface composition does.

Keywords: Osteoblast; Implant surface; Gene expression; Growth factors; Osseointegration.

1. Introdução

Diversos métodos têm sido utilizados durante a última década para modificar a textura e a composição química das superfícies de implantes dentais, todos com o objetivo de otimizar o reparo ósseo e o contato osso-implante. Especificamente em relação às modificações químicas da superfície, a alteração da camada nativa de TiO_2 (Lee et al., 2010; Li et al., 2005) e a incorporação de cerâmicas bioativas a base de cálcio e fosfato (CaP) (Coelho et al., 2009; Quaranta et al., 2010) têm recebido significativa atenção. Esse interesse é, em parte, devido à biocompatibilidade do titânio estar intimamente ligada às propriedades da camada de óxido formada na superfície (Sul et al., 2002a). Além disso, CaP é conhecido como um material bioativo que interage diretamente com o tecido ósseo circundante, uma vez que sua composição elemental é similar ao do osso natural (Narayanan et al., 2007).

A combinação destas modificações de superfície têm sido relatadas por vários autores, com ênfase para a anodização, também conhecida como oxidação anódica, e a deposição de CaP ou cristais de hidroxiapatita (HA) (Ishizawa et al., 1997; Takebe et al., 2000; Suh et al., 2003; Zhang et al., 2004; Li et al., 2005; Huang et al., 2007; Lee et al., 2010; Kim et al., 2011). Apesar da extensa caracterização física e química dessas superfícies descritas na literatura, as respostas biológicas *in vitro* desencadeadas por elas ainda não estão totalmente esclarecidas. A maioria dos trabalhos disponíveis são relacionados a eventos iniciais, como adesão celular (Takebe et al., 2000; Suh et al., 2003; Zhang et al., 2004; Huang et al., 2007; Lee et al., 2010; Kim et al., 2011), morfologia celular (Takebe et al., 2000; Suh et al., 2003; Zhang et al., 2004; Lee et al., 2010) e proliferação celular (Suh et al., 2003; Zhang et al., 2004; Li et al., 2005; Lee et al., 2010, Kim et al., 2011), em curtos períodos de tempo.

Embora a adesão e proliferação das células sobre as superfícies de implantes sejam pré-requisitos para o início da regeneração óssea, o desafio na pesquisa com implantes dentais é a capacidade da superfície em guiar a diferenciação (Lavenus et al., 2010). A diferenciação osteoblástica é controlada por uma série de hormônios, citocinas, fatores de crescimento e múltiplos

fatores de transcrição (Lee et al., 2000; Stein et al., 2004; Takagi et al., 2004; Jang et al., 2011). Uma vez que as células osteogênicas iniciam o processo de diferenciação e maturação celular, elas passam a expressar marcadores específicos de osteoblastos, incluindo genes como runt-related transcription factor 2 (Runx2) e osterix (OSX), bem como proteínas relacionadas com o processo de mineralização, como colágeno tipo I, fosfatase alcalina, sialoproteína óssea, osteopontina e osteocalcina (Tuan, 2011)

Runx2 (também conhecido como core-binding factor alpha 1, Cbfa-1) é um fator de transcrição cuja deleção tem sido associada à ausência de ossificação (Komori et al., 1997; Nakashima et al., 2002). No estágio inicial de diferenciação, Runx2 desempenha um papel importante direcionando células mesenquimais pluripotentes à linhagem de osteoblastos e desencadeando a expressão de vários genes que codificam proteínas da matriz extracelular óssea (Komori, 2009). No entanto, a expressão excessiva de Runx2 inibe a maturação dos osteoblastos e, portanto, sua inibição é necessária para a diferenciação em osteoblastos maduros, os quais formarão tecido ósseo maduro (Takagi et al., 2004; Komori, 2009). Sabe-se que a expressão de Runx2 nas células osteoblásticas está sob a regulação das proteínas morfogenéticas ósseas-2 (BMP-2) e do fator de crescimento transformador β 1 (TGF- β 1), os quais têm sido relacionados como potentes estimuladores da expressão de Runx2 durante a diferenciação osteoblástica (Lee et al., 2000; Takagi et al., 2004).

A rugosidade (Rosa e Beloti, 2003; Wennerberg e Albrektsson, 2009) e a composição da superfície (Lincks et al., 1998; Buser et al., 2004; Liu et al., 2007) parecem influenciar a migração, adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos. A incorporação de CaP na superfície dos implantes, por meio da técnica de anodização, resulta em modificação na rugosidade, composição e molhabilidade da superfície (Elias et al, 2008a), o que possibilitaria a aceleração da resposta osteoblástica e, conseqüentemente, da osseointegração. Embora vários estudos tenham investigado o efeito desta combinação sobre o reparo ósseo, ainda permanecem dúvidas quanto a

interação entre as superfícies de implante, a viabilidade/proliferação celular, a secreção de fatores de crescimento e a expressão de genes relacionados à diferenciação de osteoblastos.

Assim, foi gerada a hipótese de que a anodização com incorporação de CaP pode favorecer eventos relacionados ao processo de neo-osteogênese, como viabilidade celular e secreção de BMP-2 e TGF- β 1 pelos osteoblastos, o que regularia positivamente a expressão de Runx2. Este, por sua vez, pode influenciar a expressão gênica de importantes proteínas da matriz, como fosfatase alcalina (ALP) e sialoproteína óssea (BSP).

2. Revisão de Literatura

2.1 Diferenciação osteogênica

O osso é um tecido dinâmico, vascularizado e vivo que se modifica ao longo da vida (Davies, 2003). Microscopicamente, é uma forma altamente complexa e especializada de tecido conjuntivo, composto de uma matriz orgânica mineralizada por precipitação de cristais de fosfato de cálcio (CaP), na forma de hidroxiapatita (HA). Permeando a matriz orgânica calcificada estão as células que participam da manutenção e organização do osso: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (Barrère et al., 2006), cada uma com características e funções específicas.

Os osteoblastos são responsáveis pela síntese e secreção dos constituintes orgânicos da matriz óssea (Katsogiannis e Ng, 2004), participando de sua mineralização. À medida que os osteoblastos secretam matriz óssea, alguns deles ficam aprisionados em lacunas, passando a se chamar osteócitos. Estes mantêm uma rede intercomunicantes de lacunas que permite a difusão de nutrientes e a comunicação dos osteócitos entre si e com os osteoblastos (Gretzer et al., 2003; Watzek, 2004). Já os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, derivadas da fusão de monócitos que atravessam os capilares sanguíneos (Watzek, 2004). Estas células são responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo por meio de acidificação e degradação enzimática dos componentes inorgânicos e orgânicos da matriz, respectivamente, sendo portanto importantes no processo de remodelação óssea (Barrère et al., 2006).

Os osteoblastos derivam de células-tronco mesenquimais indiferenciadas capazes de originar diversas linhagens celulares, como condrócitos, adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e células musculares (Barrère et al., 2006). O que restringe a diferenciação em uma ou outra linhagem são fatores locais e sistêmicos (hormônios) (Watzek, 2004). Para a linhagem osteogênica, as células-tronco passam por uma série de etapas até se diferenciarem: células-tronco → células mesenquimais → células osteoprogenitoras imaturas → células osteoprogenitoras maduras →

preosteoblastos → osteoblastos maduros → osteócitos ou podem sofrer apoptose (Stein et al., 2004). Quanto mais tardia a fase da diferenciação, menor a capacidade de renovação e proliferação celular (Aubin 2001).

O caminho da diferenciação osteoblástica é modulado por várias moléculas: (1) hormônios, incluindo ácido retinóico, glucocorticóides, estrógeno, hormônios da paratireóide, vitamina D e tiroxina (Muschler et al., 2002; Stein et al., 2004); (2) citocinas (Muschler et al., 2002); (3) fatores de crescimento, dentre eles o fator de crescimento transformador (TGF), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) (Muschler et al., 2002; Davies, 2003; Stein et al., 2004; Jang et al., 2011); (4) e também por múltiplos fatores de transcrição, dentre os quais destacam-se Runx2, OSX, AJ18, Dlx5 e Msx2 (Lee et al., 2000; Stein et al., 2004; Takagi et al., 2004; Komori, 2010).

Fatores de transcrição são proteínas que regulam a transcrição de outros genes por meio da ligação a sequências específicas do DNA. Dentre os fatores de crescimento importantes para a diferenciação dos osteoblastos, Runx2 tem sido relatado como o primeiro a ser expresso (Komori et al., 1997), marcando o direcionamento de células mesenquimais indiferenciadas para a linhagem osteoblástica (Komori, 2010), ou seja, a sua maturação. Runx2 também regula a expressão de marcadores osteogênicos, como os genes que codificam proteínas da matriz extracelular óssea, ora os ativando ora os suprimindo (Stein et al., 2004). Entretanto, sozinho ele não é suficiente para suportar o término da diferenciação osteoblástica. Subsequentemente ao direcionamento para a linhagem osteogênica mediado por Runx2, o estabelecimento do fenótipo maduro de osteoblasto é reforçado por Osterix (Stein et al., 2004), um regulador dos estágios finais da diferenciação (Nakashima et al., 2002; Stein et al., 2004). Desta maneira, os genes que codificam os fatores de transcrição são chamados de “genes-mestres”, uma vez que possuem sequências codificadoras capazes de regular eventos chaves na diferenciação dos osteoblastos (Perinpanayagam et al., 2006).

A expressão dos “genes-mestres” parece estar sob o controle de moléculas sinalizadoras como BMP-2 e TGF- β 1 (Zarb et al., 2002; Takagi et al., 2004; Watzek, 2004), produzidas pelos próprios osteoblastos e também por células inflamatórias (no caso do TGF- β 1). Essas moléculas encontram-se estocadas na matriz óssea mas, numa situação de lesão tecidual, são liberadas (Millis, 1999) e promovem replicação, diferenciação, síntese de proteínas e/ou migração de tipos celulares apropriados (Junker et al., 2009). Uma vez que um fator de crescimento liga-se ao receptor de uma célula-alvo, ele induz a tradução de um sinal intracelular que gera uma resposta biológica (Jonge et al., 2008), podendo aumentar ou diminuir a expressão de “genes-mestres”, por exemplo. Estudos *in vitro*, utilizando cultura de células precursoras de osteoblastos tratadas com BMP-2 e TGF- β 1, têm demonstrado que Runx2 é o principal gene-alvo compartilhado pelas vias de sinalização de ambos esses fatores (Lee et al., 2000) e que os mesmos são potentes estimuladores da expressão de Runx2 durante a diferenciação de osteoblastos (Takagi et al., 2004).

Uma vez diferenciadas em osteoblastos, as células produzem os componentes orgânicos da matriz, predominantemente constituídos pela proteína colágeno do tipo I (85%), com pequenas quantidades de colágenos tipo III e V (5%). As proteínas não colágenas da matriz, como osteopontina, osteonectina, sialoproteína óssea, osteocalcina e proteoglicanos, perfazem os 10% restantes (Tzaphilidou, 2005). As proteínas não colágenas da matriz são importantes na mineralização, organizam a matriz extracelular, controlam as interações célula-célula, célula matriz, e enviam sinais para as células ósseas (Davies, 2000; de Oliveira et al., 2003; Watzek, 2004), sendo portanto considerados marcadores osteogênicos bastante úteis. A osteopontina (OPN) é expressa nos estágios iniciais da osteogênese (Aubin et al., 1998) e tem demonstrado inibir o crescimento dos cristais de hidroxiapatita (Hunter et al., 1996). A osteonectina tem sido sugerida como promotora da mineralização de colágeno (Termine et al., 1998). A expressão da sialoproteína óssea (BSP) coincide com a diferenciação osteoblástica final e o começo da mineralização (Lamour et al., 2007). A osteocalcina (OCN) é considerada o marcador

osteogênico tardio mais específico, sendo indetectável em pré-osteoblastos, mas abundantemente encontrado em osteoblastos maduros (Aubin et al., 1998).

Além da regulação exercida pelas proteínas da matriz, a mineralização também é regulada por enzimas, principalmente pela fosfatase alcalina (ALP) (Rosa e Beloti, 2003; Declercq et al., 2005). A fosfatase alcalina é um marcador inicial da diferenciação osteoblástica que está presente em todas as membranas celulares, entretanto é encontrada em maiores concentrações em células que mineralizam sua matriz, como os osteoblastos maduros (Owen et al., 1990). Em cultura de células osteogênicas, um aumento nas atividades e expressão de fosfatase alcalina (ALP) marca o início da mineralização e a diferenciação das células osteogênicas em fenótipo de osteoblasto (Davies, 2003; Beloti e Rosa, 2005).

A determinação da expressão dessas proteínas e genes tem sido utilizada como uma das ferramentas para análise da sequência temporal de diferenciação e mineralização frente a diferentes superfícies de implante. Somado a isso, utilizam-se também avaliações quanto à adesão e proliferação celular, estágios que antecedem a diferenciação e produção de matriz mineralizada, mas que são etapas cruciais no processo de neo-osteogênese.

2.2 Biologia da Osseointegração

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). Durante a preparação do sítio e instalação cirúrgica de um implante no tecido ósseo, vários eventos ocorrem simultaneamente, como rompimento dos vasos sanguíneos, adsorção de proteínas plasmáticas à superfície de titânio e extravasamento de eritrócitos, plaquetas e leucócitos no local. Em poucos minutos o sangue sofre

coagulação, ocorrendo ativação plaquetária. A ativação plaquetária induz o processo de degranulação e secreção de metabólitos do ácido aracdônico (fosfolípidos), fatores de crescimento (PDGF, TGF- β) e fatores vasoativos (serotonina e histamina) para o meio extracelular. Essa ativação tem um papel importante na formação da rede de fibrinas do coágulo bem como no recrutamento, migração e proliferação de células osteogênicas e angiogênicas (Davies, 2003).

Uma vez cessada a hemorragia, ocorre isquemia e necrose do tecido ósseo periimplantar. Os mecanismos de resposta, dentre os quais se destacam os fatores de sinalização e quimiotaxia, levam à destruição do coágulo por leucócitos que aparecem no local do trauma após aproximadamente 10 minutos. Os neutrófilos são as primeiras células a atingirem o sítio do implante, mas em seguida os macrófagos tornam-se predominantes. Os osteoclastos também entram em ação reabsorvendo o osso necrótico por meio de mecanismos de fagocitose (Davies, 2003).

A infiltração de glóbulos brancos é seguida pela invasão do sítio cirúrgico pelas células osteogênicas que, estimuladas por citocinas e fatores de crescimento, migram em direção à superfície do implante através da matriz tridimensional de fibrina. Durante esta migração, ocorre contração desta matriz. A habilidade que a superfície do implante tem para reter esta fibrina durante o processo de contração da matriz é de fundamental importância, e determina se a migração das células irá ou não atingir a superfície (Davies, 2003).

Assim que as células osteogênicas atingem a superfície do implante, elas se diferenciam em osteoblastos ativos com a polarização dos núcleos e secreção de matriz óssea por aposição. O estágio inicial da formação óssea consiste na secreção da matriz orgânica cementária sem colágeno, que possui sítios de nucleação para induzir a mineralização por íons cálcio e fosfato. São identificadas nessa matriz proteínas não-colágenas, como osteopontina, sialoproteína e proteoglicanos. Após sua mineralização, inicia-se a formação de matriz óssea rica em colágeno. Dessa forma, pode-se concluir que o compartimento colagenoso da matriz neoformada é separado da superfície do

implante por uma camada de tecido calcificado livre de colágeno ou matriz cementária (Davies, 2003).

Este processo, conhecido como osteogênese de contato, ocorre a partir da superfície do implante em direção centrífuga à superfície óssea peri-implantar pré-existente. Para sua ocorrência, é necessário a osteocondução (recrutamento e migração) das células osteogênicas até a superfície. Entretanto, este não é o único processo responsável pela formação óssea ao redor dos implantes. Na osteogênese à distância, o novo tecido ósseo é formado a partir da superfície do osso pré-existente e não da superfície do implante (Davies, 2003; Marco et al., 2005). A ocorrência de um ou de outro processo depende do tratamento de superfície do implante e é um dos desafios da Ciência de Materiais.

2.3 Titânio como material de implante

A engenharia tecidual óssea aplica os princípios de biologia e engenharia para desenvolver substitutos funcionais para o tecido ósseo danificado, a fim de restaurar, manter ou melhorar sua função. Para tanto, são necessários três elementos chaves: (1) um arcabouço tridimensional (chamado “scaffold”) combinado com (2) células e/ou (3) moléculas osteoindutoras (como fatores de crescimento). O arcabouço fornece suporte mecânico e serve como substrato sobre o qual as células se aderem, proliferam e se diferenciam. Neste sentido, os implantes metálicos utilizados para reconstruções ósseas em ortopedia, cirurgia plástica e cirurgia craniofacial, e como substitutos para o elemento dentário na Odontologia, especialmente na implantodontia oral, podem ser considerados “scaffolds” (Jonge et al., 2008).

O titânio comercialmente puro (Ti cp) e as ligas de Ti-6Al-4V são os materiais mais comumente utilizados na fabricação de implantes dentais devido a propriedades como boa resistência mecânica, módulo de elasticidade relativamente baixo, excelente biocompatibilidade e a alta resistência à

corrosão (Brunette et al., 2001; Liu X et al., 2004). A biocompatibilidade e a resistência à corrosão dos implantes de titânio são atribuídas à presença de uma fina camada de óxido de poucos nanômetros de espessura, principalmente dióxido de titânio (TiO₂), que se forma espontaneamente sobre a superfície do implante quando o mesmo é exposto ao oxigênio (Sul et al., 2002a; Bose et al., 2009). Esta camada se mantém estável em condições fisiológicas (Lima, 2003), o que é de extrema importância para o contato com os fluidos corpóreos e a interação com diversas proteínas e tipos celulares, após a instalação cirúrgica do implante (Le Guehennec et al., 2008). A estabilidade química do óxido evita a formação de tecido fibroso ao redor dos implantes e possibilita o contato direto ao tecido ósseo, garantindo a osseointegração (Jonge et al., 2008).

Apesar do sucesso clínico a longo prazo relatado para implantes de titânio com camadas de óxido “nativas” (> 95% após 5 anos e > 90% após 10 a 15 anos) (Buser et al., 1997; Schwartz-Arad et al., 2007), podem haver situações em que o implante necessita ser modificado para acelerar a osseointegração (Sul et al., 2002b). Essas situações incluem a instalação de implantes em regiões de quantidade e qualidade ósseas ruins (Friberg et al., 2000), que tornam-se frequentes com o aumento da expectativa de vida da população, acompanhada pelo aumento de comorbidades, como diabetes, oclusão vascular e história de radioterapia em cabeça e pescoço (Mueller et al., 2011). Somado a isto, o titânio e suas ligas não são materiais bioativos para induzir a formação de tecido ósseo diretamente a partir de suas superfícies (Huang et al., 2007). Ao contrário, os implantes de titânio são simplesmente incorporados pelo contato ósseo (Yan et al., 1997), levando assim meses para a formação de uma boa fixação no osso (Huang et al., 2007).

2.4 Modificações de superfície do titânio

O desejo de acelerar e melhorar a osseointegração em períodos iniciais após a implantação direcionou muitas pesquisas e esforços na implantodontia, particularmente para superar as limitações de pacientes com

algum comprometimento ósseo, seja por doença ou pela idade (Gittens et al., 2011). Dentre os fatores que podem influenciar a osseointegração, a superfície do material é determinante na biocompatibilidade e no processo de reparo por estar em íntimo contato com os tecidos biológicos na área de implantação (Nanci et al. 1998). Estudos prévios demonstraram que características das superfícies de implante, como rugosidade (Boyan et al., 1998; Gittens et al., 2011), composição (Sul et al., 2005; Liu et al., 2007), energia e molhabilidade (Buser et al., 2004; Zhao et al., 2005), influenciam significativamente a adsorção de proteínas, a proliferação e a diferenciação celular, bem como a produção de fatores locais (Schwartz et al., 2008; Gittens et al., 2011; Kubies et al., 2011). Portanto, a taxa, a quantidade e a qualidade da osseointegração estão relacionadas com as propriedades físico-químicas das superfícies (Le Guéhennec et al., 2007; Junker et al., 2009).

Desta maneira, diversas modificações das superfícies de implante têm sido desenvolvidas, ou por alteração na topografia ou por alteração na composição química, ou por ambos. As modificações físicas na topografia das superfícies compreendem alterações na morfologia e rugosidade das mesmas tanto em escala micrométrica, quanto nanométrica. Já as modificações químicas, compreendem tanto a incorporação de moléculas inorgânicas à superfície (como as diversas fases de cálcio fosfato), quanto moléculas orgânicas (peptídeos, enzimas, proteínas e fatores de crescimento) (Schliephake e Scharnweber, 2008; Ennenfest et al., 2010).

2.5 Modificações físicas de superfície

Atualmente, a morfologia e composição das superfícies são controladas em nível micrométrico (Tomsia et al., 2010), sendo que a maioria das modificações disponíveis resultam em padrões de rugosidade da ordem de 0,5 a 2 μm (Coelho et al., 2009). O aumento da rugosidade em microescala procura mimetizar as características da superfície com características de tamanho comparáveis à do tecido ósseo, como as regiões de depressão

resultantes da reabsorção osteoclástica e as próprias dimensões celulares (Zhao et al., 2006).

Entretanto, a resposta tecidual é principalmente ditada por processos controlados em escala nanométrica (Tomsia et al., 2010), que corresponde diretamente ao tamanho das proteínas e dos receptores da membrana celular (Gittens et al., 2011). Não está completamente esclarecido se superfícies nanotexturizadas são significativamente melhores que superfícies microestruturadas ou se, na verdade, é a combinação entre topografia e composição de superfície que as tornam melhores (Tomsia et al., 2010).

Embora não esteja claro qual o melhor padrão de rugosidade, é consenso que superfícies rugosas, comparadas com as usinadas ou lisas, aumentam o contato osso-implante *in vivo*, melhorando o embricamento mecânico com o tecido ósseo ao redor, o que favorece a estabilidade do implante (Hansson et al., 1999; Tomsia et al., 2010). Segundo Wennerberg et al. (2003), a mudança adequada na rugosidade superficial pode apresentar melhores resultados em relação à força de ancoragem e travamento mecânico nos estágios iniciais da osseointegração.

Em nível celular, a rugosidade das superfícies ainda pode otimizar a adesão, proliferação e diferenciação celular (Boyan et al., 1998; Rosa e Beloti, 2003; Sader et al., 2005; Tomsia et al., 2010). Células osteoblásticas se aderem mais a superfícies rugosas (Davies, 2003; Marco et al., 2005) e apresentam características morfológicas de osteoblastos em um estado mais diferenciado, secretando maior quantidade de marcadores como fosfatase alcalina (de Oliveira e Nanci, 2004; de Oliveira et al., 2007) e osteocalcina (Lincks et al., 1998, Marco et al., 2005). Estudos sobre expressão gênica também demonstraram que superfícies com topografia rugosa favorecem positivamente a síntese de colágeno, Runx2 e osteocalcina (Mendonça et al., 2011). Mendonça et al. (2010), ao combinar micro e nanotopografia, demonstraram maiores níveis de expressão para Runx2, OSX, ALP, BSP e OCN.

A microtopografia proporciona uma maior área de adesão para o coágulo de fibrina que se forma logo após a implantação, facilitando a migração de células osteogênicas para a superfície do material, bem como a ocorrência de osteogênese por contato (Davies, 2003; Tomsia et al., 2010). Além do mais, superfícies rugosas também potencializam a ativação plaquetária, que é de extrema importância nos estágios iniciais de reparo, uma vez que resulta na liberação de citocinas e fatores de crescimento essenciais para angiogênese local e a quimiotaxia de diferentes tipos celulares, inclusive células osteogênicas (Park e Davies, 2000).

Vários métodos têm sido desenvolvidos a fim de obter superfícies rugosas e melhorar a osseointegração dos implantes dentais. Dentre os tratamentos que modificam apenas a topografia da superfície estão: spray de plasma de titânio, jateamento, ataque ácido, jateamento seguido de ataque ácido (Le Guéhennec et al., 2007). Entretanto, antes de descrever as características de cada técnica é importante estabelecer que o ponto de partida das superfícies de implante foram as usinadas.

Comercialmente, as superfícies usinadas são conhecidas como superfícies lisas, mas apresentam micro-ranhas resultantes do próprio processo de torneamento do metal. Apesar de terem sido utilizadas como padrão ouro por décadas na implantodontia, eram necessários vários meses para a osseointegração do implante, de acordo com protocolos clássicos (Coelho et al., 2009). Provavelmente porque a mínima rugosidade dessas superfícies não é suficiente para que o titânio atue como indutor na migração de células osteogênicas pela rede de fibrinas, o que resulta na formação de tecido ósseo por osteogênese a distância (Sul, 2003).

Assim, buscando o desenvolvimento de superfícies mais rugosas, o spray de plasma de titânio foi bastante utilizado. Esta técnica consiste na projeção de partículas de titânio em direção à superfície, por um feixe de plasma em altas temperaturas, resultando na condensação e fusão dessas partículas para formar a cobertura. Este procedimento aumenta substancialmente a área da superfície do implante, além de aumentar consideravelmente a sua rugosidade ($>2 \mu\text{m}$) (Le Guéhennec et al., 2007;

Coelho et al., 2009). Entretanto, a possibilidade de delaminação das partículas de Ti durante a instalação ou carregamento funcional dos implantes, fizeram com que os mesmos caíssem em desuso (Schliephake e Scharnweber, 2008).

Neste sentido, emergiram duas técnicas que se encontram disponíveis comercialmente até os dias atuais: o jateamento e o ataque ácido. O jateamento consiste no bombardeamento de partículas, como sílica, alumina (Al_2O_3), dióxido de titânio (TiO_2) e biocerâmica reabsorvível (RBM), criando por meio da abrasão uma superfície com ranhuras irregulares. Essas ranhuras variam de acordo com o tamanho e a forma das partículas e também das condições do jateamento (pressão, distância do bico do jato à superfície do implante, tempo de jateamento). No entanto, o jateamento com sílica e alumina podem deixar partículas residuais que podem causar uma resposta inflamatória que prejudica a osseointegração.

Assim, o ataque ácido posterior ao jateamento têm sido utilizado a fim de remover subprodutos do processamento (Coelho et al., 2009). Superfícies modificadas por ácidos resultam da imersão em ácidos fortes como clorídrico, fluorídrico, nítrico e sulfúrico, separadamente ou combinados. Este tratamento origina mini-escavações na superfície, mas a morfologia varia com as condições de tratamento (ácido, concentração, tempo de condicionamento e temperatura) (Le Guéhennec et al., 2007; Coelho et al., 2009).

2.6 Modificações químicas de superfície

Além das modificações topográficas dos implantes, modificações químicas da superfície também influenciam a resposta óssea. A composição e a energia superficial são críticas para a adsorção de proteínas e adesão osteoblástica por afetar a molhabilidade do implante (Le Guéhennec et al., 2007; Junker et al., 2009), que é a tendência de um determinado fluido espalhar ou aderir sobre uma superfície sólida. Superfícies altamente hidrofílicas (ângulos de contato pequenos) parecem ser mais desejáveis do que as hidrofóbicas (ângulos de contato maiores) devido às suas interações com

fluidos biológicos, células e tecidos (Buser et al 2004; Zhao et al, 2005). Sendo assim, a molhabilidade é um parâmetro utilizado para avaliar a biocompatibilidade, uma vez que superfícies hidrofílicas permitem maior contato do coágulo com a superfície do implante (Elias et al., 2008). Além do mais, estudos recentes têm sugerido que modificações químicas na superfície do titânio usando moléculas bioativas melhoram e/ou aceleram o processo de diferenciação osteoblástica. Como as moléculas são integradas na estrutura do implante, elas são liberadas gradualmente, agindo como um sistema lento de liberação de agentes osteogênicos no sítio de implantação (Liu Y et al., 2004).

Dentre todas as modificações químicas de superfície do implante, a cobertura com fosfatos de cálcio (CaP), principalmente hidroxiapatita (HA), tem recebido atenção significativa (Coelho et al., 2009). O interesse em usar esse material é devido a sua similaridade química com o osso natural, bem como a possibilidade de combinar as propriedades mecânicas do titânio com as propriedades biológicas dos fosfatos de cálcio (Narayanan et al., 2008), como a bioatividade. Geralmente, materiais bioativos interagem com o osso ao redor formando uma união química a este tecido, chamada de “bone-bonding” (Mendes et al., 2007), e não somente mecânica como ocorre nas superfícies modificadas apenas fisicamente. O fenômeno da bioatividade é determinado principalmente por fatores químicos, como a fase do cristal e a estrutura molecular do material, bem como fatores físicos, como a rugosidade e porosidade da superfície (Jonge et al., 2008).

Após a implantação, substratos contendo coberturas com CaP sofrem dissolução dessa cobertura na forma de íons de cálcio e fosfato, causando a supersaturação dos fluidos corpóreos na região peri-implantar. Isso leva à precipitação de uma camada biológica de apatita sobre a superfície do implante, que incorpora proteínas e serve como uma matriz para a adesão e diferenciação de células osteoprogenitoras (Le Guéhennec et al., 2007). Em adição à dissolução, os osteoclastos são capazes de degradar a cobertura de CaP por vias enzimáticas, criando vales de reabsorção que servirão como estímulo para deposição de tecido ósseo pelos osteoblastos (Lavenus et al.,

2010). Como resultado, as coberturas com CaP promovem a deposição de direta de tecido ósseo sobre a superfície (osteogênese de contato), acelerando a osseointegração quando comparadas a superfícies sem coberturas. Entretanto, o desafio deste tipo de superfície é criar coberturas com CaP que dissolvam em uma taxa similar com a de aposição óssea, a fim de obter um contato direto osso-implante (Lavenus et al., 2010). Caso contrário, a estabilidade mecânica ficaria comprometida (Salgado et al., 2004).

Coberturas com CaP ou HA podem ser obtidas por diferentes métodos: plasma spray, deposição por pulverização catódica, deposição sol-gel, deposição a laser pulsado, deposição assistida de feixe iônico (DAFI), deposição cristalina discreta (DCD), deposição eletroquímica, deposição eletroforética, tratamento hidrotérmico, precipitação biomimética (Narayanan et al., 2008). Dentre eles, a cobertura biocerâmica mais disponível comercialmente é a obtida por plasma spray de hidroxiapatita (PSHA) (Coelho et al., 2009). Normalmente, a fim de obter retenção mecânica para a cobertura de HA, os implantes que sofrem essa modificação devem ser tratados anteriormente por jateamento ou ataque ácido a fim de garantir a integridade física da cobertura durante a instalação e função do implante (Lacefield, 1998).

A cobertura de implantes com HA por PSHA mostra-se interessante na medida em que aumenta significativamente a união osso-biocerâmica e o contato osso-implante *in vivo*, em períodos iniciais após a implantação (Lacefield, 1998; Yang et al., 2005; Coelho et al., 2009). Porém, esse tipo de tratamento está em desuso na prática odontológica, uma vez que a cobertura de HA não dissolve/degrada uniformemente após longos períodos em função (Yang et al., 2005; Coelho et al., 2009). Isto pode levar à delaminação da cobertura a partir da superfície de titânio e falha adesiva na interface biocerâmica-substrato metálico, apesar de a interface biocerâmica-osso ser firmemente aderida (Le Guéhennec et al., 2007; Coelho et al., 2009; Junker et al., 2009).

A modificação eletroquímica por oxidação anódica a micro-arco, também conhecida como anodização, mostra-se como uma alternativa

interessante para deposição de coberturas de CaP (Ishizawa et al., 1997; Li et al., 2005; Sul et al., 2005). Narayanan et al. (2008), ao compararem a estabilidade das coberturas de CaP obtidas por diferentes métodos, constataram que a taxa de dissolução da cobertura depende da fase da biocerâmica (se cristalina ou amorfa). Coberturas de CaP altamente cristalinas têm baixa taxa de dissolução nas soluções fisiológicas, proporcionando estabilidade a longo prazo para o implante. Entretanto, essas coberturas também possuem baixas taxas de reprecipitação na forma de apatita, o que pode não ser uma situação ideal. Por outro lado, coberturas de CaP amorfas possuem altas taxas de dissolução e precipitação, o que é desejável até certo ponto. Isto porque o implante precisa de estabilidade mecânica nos estágios iniciais de implantação e uma dissolução excessiva pode não suportar. As coberturas de CaP obtidas por PSHA, DAFI e laser pulsado são heterogêneas, contendo partículas cristalinas embebidas em uma fase amorfa fundida o que garante rápida dissolução e pobre estabilidade. Já coberturas obtidas por processos biomiméticos e eletroquímicos, como a anodização, possuem cristais uniformes com taxa de dissolução homogênea nos fluidos corporais.

Pelo processo de anodização, os implantes são imersos em eletrólitos contendo soluções de ácidos, bases ou sais, sendo submetidos à aplicação de corrente constante (modo galvanostático) ou de potencial constante (modo potencioestático) (Schliephake e Scharnweber, 2008). Sob essas condições, múltiplos micro-arcos ocorrem na interface implante/eletrólito resultando na quebra da camada de dióxido de titânio “nativa”. Quando isso ocorre, íons de titânio (Ti) do implante e grupamentos hidroxilas (OH) do eletrólito movem-se em direções opostas para formar TiO_2 novamente (Li et al., 2004). A nova camada de óxido formada incorpora Ca e P, no caso de eletrólitos contendo acetato de cálcio e glicerofosfato, sendo úteis para a formação de hidroxiapatita (Kim e Ramaswamy, 2009). Dependendo das condições de anodização (voltagem, composição do eletrólito, temperatura e corrente) (Liu et al., 2005) é possível controlar a rugosidade, porosidade, composição química e espessura da camada de óxido, a fim de melhorar as

propriedades da mesma para efetiva bioimplantação (Kim e Ramaswamy, 2009).

As principais vantagens associadas com esta modificação de superfície são: (1) o aumento da rugosidade superficial aumenta a energia de superfície, o que melhora a adsorção de proteínas, bem como a retenção da matriz de fibrina para migração das células osteogênicas; (2) o aumento da espessura da camada de TiO_2 , aumenta a biocompatibilidade e a resistência à corrosão; (3) e, finalmente, a incorporação de componentes inorgânicos originados de eletrólitos para o interior da camada de óxido, como cálcio e fosfato, altera a composição da superfície e aumenta a bioatividade (Schliephake e Scharnweber, 2008). Camadas de óxido geradas por anodização com incorporação de CaP demonstram melhorar significativamente atividades celulares *in vitro* de adesão e proliferação (Takebe et al., 2000; Lee et al., 2010) bem como o contato osso-implante (Ishizawa et al., 1997) e o torque de remoção (Elias et al., 2008a; Elias et al., 2008 b) *in vivo*.

Embora as coberturas com CaP tenham sua eficácia comprovada para propósitos de “bone-bonding”, a aceitação universal de sistemas com coberturas de CaP ainda não foi atingida (Jonge et al., 2008). Uma superfície que fosse capaz de favorecer o processo de reparo, influenciando a adesão e diferenciação celular pela sua microtextura, e que também interferisse positivamente no processo de mineralização da matriz devido ao seu conteúdo de CaP, sem prejudicar as propriedades mecânicas do implante, seria o padrão ouro para a implantodontia. Para tanto, estudos *in vitro* do comportamento dos osteoblastos sobre as superfícies de titânio são etapas essenciais na construção deste conhecimento e validação do uso clínico dessas superfícies.

2.7 Osteogênese *in vitro*

Na implantodontia, modificações químicas e físicas dos implantes, alterando a rugosidade superficial, podem ser avaliadas *in vivo*, utilizando modelos biológicos com cães, coelhos, macacos, e também *in vitro*, utilizando cultura de células (Davies, 2003). A cultura de células geralmente foca no aspecto morfológico, capacidade de crescimento, estado de diferenciação, viabilidade e adesão dos osteoblastos em contato com diferentes superfícies de titânio (Anselme, 2000). Vários modelos de cultura de osteoblastos são utilizados para avaliar a interação célula-superfície, sendo que os mais comumente utilizados são as culturas primárias derivadas de osteoblastos humanos normais (explantes ósseos, células da medula óssea) e fragmentos ósseos de roedores, ou linhagens de osteoblastos provenientes de osteosarcoma humano (Liu et al., 2007). Cada uma dessas fontes celulares tem suas vantagens e limitações (Harris et al., 1995; Subramanian et al., 2002).

Osteoblastos humanos primários, por exemplo, tem fenótipo de osteoblastos normais, mas são muito fastidiosas *in vitro*, crescendo muito lentamente e com um tempo de vida limitado quando trazidos com sucesso para a cultura. Culturas derivadas de roedores geralmente contornam estes problemas, mas podem não ser modelos apropriados para os humanos devido a diferenças entre as espécies nas características fenotípicas. Linhagens derivadas de osteosarcomas crescem prontamente *in vitro*, proliferam infinitamente, mas não exibem fenótipo normal. Elas ainda podem responder de forma anormal para diversos hormônios e citocinas comparadas a osteoblastos humanos normais, diferenciados (Liu et al., 2007). A fim de superar essas limitações, Harris et al. (1995) estabeleceram uma linhagem de osteoblastos humanos fetais imortalizados (hFOB 1.19) com capacidade de se proliferar e expressar marcadores fenotípicos durante a diferenciação, bem como mineralizar sua matriz extracelular. Mais tarde, Subramanian et al. (2002) caracterizaram hFOB 1.19 como uma linhagem imortalizada, mas não transformada, com mínimas anormalidades cromossômicas e espectro normal de proteínas da matriz.

Dessa forma, avaliações de biomateriais utilizando culturas imortalizadas de hFOB 1.19, embora não representem modelos fidedignos do padrão de resposta celular ao redor de implantes, apresentam maior reprodutividade, uma vez que já se conhece o comportamento das células e evita-se variáveis como gênero, raça, idade, tempo de vida celular e tempo para proliferação celular, geralmente relacionadas a estudos utilizando culturas primárias obtidas de humanos.

3. Proposição

3.1 Objetivo geral

Investigar a influência da anodização com incorporação de cálcio e fósforo no processo de osteogênese *in vitro*, comparando com outros dois tipos de superfícies de titânio (ataque ácido e usinada).

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar a viabilidade ao longo do tempo de osteoblastos cultivados sobre as superfícies de titânio;

3.2.2 Analisar o efeito das diferentes superfícies de implante sobre a expressão de genes importantes para a diferenciação osteoblástica, como *Runx2*, fosfatase alcalina (*ALP*) e sialoproteína óssea (*BSP*);

3.2.3 Avaliar a influência das modificações nas superfícies sobre a secreção de BMP-2 e TGF- β 1 pelos osteoblastos;

3.2.4 Determinar a relação dos diferentes tratamentos de superfície na associação entre secreção de fatores de crescimento com expressão de *Runx2*, bem como na associação de *Runx2* com a expressão de *ALP/BSP*.

4. Material e Métodos

4.1 Obtenção e caracterização das superfícies de titânio

Discos de titânio comercialmente puro (ASTM grau IV) de 8,0 mm de diâmetro por 4,0 mm de altura foram fabricados para esta pesquisa pela empresa Conexão Sistema de Próteses (Arujá, SP, Brasil). Os espécimes (n= 21discos/grupo) receberam três tipos de tratamentos de superfície a fim de obter morfologias semelhantes a implantes comercialmente disponíveis: usinado (Screw[®]) – controle de heterogeneidade, ataque ácido (Porous[®]) e bio-anodizado (Vulcano[®]) (Figura 1). Os discos usinados foram obtidos a partir do torneamento de barras de titânio e não receberam qualquer tratamento adicional que possibilitasse a modificação da textura ou composição química do metal. Os discos tratados com ácido foram imersos em uma mistura contendo ácido nítrico (HNO₃), clorídrico (HCl) e sulfúrico (H₂SO₄). Já as amostras bio-anodizadas foram preparadas pelo método de oxidação anódica a microarco em solução eletrolítica contendo Ca e P sob altas tensões, no modo galvanostático (Elias et al., 2010).

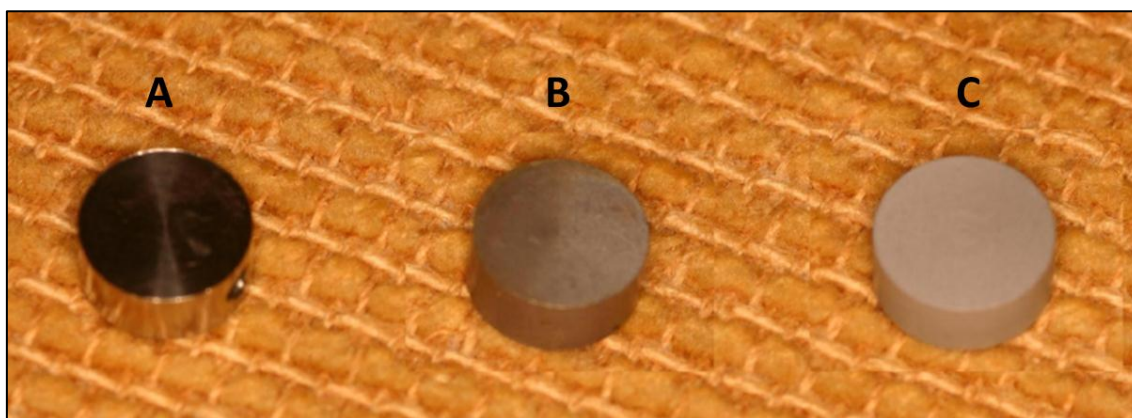


Figura 1: Discos de titânio com diferentes tratamentos de superfície similares a implantes disponíveis comercialmente: (A) usinado (Screw), (B) ataque ácido (Porous) e (C) anodizado com CaP (Vulcano).

A rugosidade, molhabilidade e morfologia dessas superfícies foram previamente determinadas utilizando rugosímetro a laser, goniômetro e microscópio eletrônico de varredura, respectivamente (Elias et al., 2008b). A rugosidade foi determinada pelo valor de Ra (média aritmética da altura dos picos) e a molhabilidade pela mensuração do ângulo de contato entre água destilada e as superfícies dos discos (Tabela 1). A composição química da superfície foi investigada por meio de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X, cujo espectro para as amostras bio-anodizadas demonstrou a presença de picos característicos dos óxidos de titânio, cálcio e fósforo, bem como de carbono (Elias et al., 2008b).

Tabela 1. Valores médios e desvios padrões da rugosidade (Ra) e molhabilidade (ângulo de contato) das superfícies de implantes

	<i>Rugosidade (μm)</i>	<i>Ângulo de contato ($^{\circ}$)</i>
Grupo	Ra	Água destilada
Screw [®]	Controle	73,10 \pm 3,55
Porous [®]	0,67 \pm 0,10	66,34 \pm 9,20
Vulcano [®]	0,87 \pm 0,19	47,25 \pm 2,94

(Modificada de Elias et al., 2008b)

4.2 Cultura de células

Osteoblastos fetais humanos da linhagem hFOB 1.19 (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) foram utilizados para esta investigação por expressarem marcadores fenotípicos de osteoblastos e mineralizarem sua matriz extracelular (Liu et al., 2007; Setzer et al., 2009). As células foram cultivadas em placas de petri estéreis contendo uma mistura de 1:1 de meio Eagle modificado por Dulbecco (alta glicose) e Hams F12 (DMEM/F12) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementada com 10% de soro

fetal bovino (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) e 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina/anfotericina) (Invitrogen). As culturas foram mantidas em estufa umidificadora a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de ar até atingirem confluência.

Para que o plaqueamento fosse realizado, as células foram soltas do fundo da placa por descolamento enzimático com solução de tripsina e EDTA por 5 minutos a 37°C. Após este tempo, as células desprendidas foram coletadas e a ação proteolítica da tripsina foi inibida pela adição de soro fetal bovino à suspensão. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 1500rpm, a 22°C e o “pellet” obtido foi ressuspendido em DMEM/F12. As células foram contadas em hemocitômetro e plaqueadas na densidade de 2×10^4 células/poço sobre os discos de titânio em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA). Cada poço foi completado com 1 mL de meio, sendo que a cada três dias o mesmo era trocado e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase.

Após 3, 7 e 14 dias de cultura, os sobrenadantes foram coletados para dosagem dos fatores de crescimento BMP-2 e TGF- β 1. Nos mesmos tempos experimentais, foi avaliada a viabilidade dos osteoblastos, bem como realizada coleta dos discos com as células aderidas para isolamento do RNA e análise da expressão gênica.

4.3 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico MTT-Formazan. Este método é baseado na clivagem redutora de MTT (um sal amarelo) para formazan (um composto azul escuro) por enzimas mitocondriais presentes em células vivas. Brevemente, de cada poço, 600 μ L de meio de cultura foram aspirados e armazenados a -70 °C até a utilização, restando 400 μ L. A atividade enzimática foi determinada adicionando 40 μ L/poço de MTT (M-

2128, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), na concentração de 5 mg/ml, seguida de incubação das placas a 37 °C por 4 h. Após o período de incubação, os cristais de formazan resultantes foram dissolvidos com 400 µL/poço de dimetil sulfoxido (DMSO, Labsynth, Diadema, SP, Brasil). Em seguida, o conteúdo de cada poço foi homogeneizado utilizando um micropipetador e uma alíquota de 100 µL de cada um foi transferida para poços separados em uma placa de 96 poços (Corning Incorporated).

A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Instrutherm Espectrofotômetro UV-2000A, São Paulo, SP, Brasil) a 570 nm. A densidade óptica de cada poço foi proporcional à quantidade de cor. Para todos os tempos experimentais, os testes foram realizados em quadruplicata.

4.4 Análise da expressão gênica

Foi utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real (RT-PCR) para analisar a expressão dos genes runt-related transcription factor 2 (*Runx2*), fosfatase alcalina (*ALP*) e sialoproteína óssea (*BSP*) nas camadas de células aderidas sobre os discos de titânio, em triplicata.

4.4.1 Extração do Ácido Ribonucléico (RNA) total

Ao final de cada tempo experimental, o sobrenadante foi removido dos poços e os mesmos foram lavados e aspirados, cuidadosamente, duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1x. Em seguida, aplicou-se 1mL de reagente de TRIzol® (Ambion®, Invitrogen) em cada poço para lise celular. Com auxílio de um “cell scraper”, os poços foram raspados vigorosamente e os sobrenadantes coletados e transferidos para tubos

eppendorf devidamente identificados, que foram incubados à temperatura ambiente por 10 minutos.

Após este período, 200 µL de clorofórmio foram acrescentados a cada tubo. Estes foram agitados no agitador Vortex por 15 segundos e incubados novamente à temperatura ambiente por mais 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A centrifugação separa a mistura em três fases: uma fase orgânica vermelha inferior (contendo proteína), uma interfase (contendo DNA) e uma fase aquosa incolor superior (contendo RNA).

Cuidadosamente, a porção incolor foi coletada e transferida para novos tubos eppendorf contendo 500 µL de isopropanol. A mistura resultante permaneceu por 10 minutos em temperatura ambiente, após a qual foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. Este passo faz com que o RNA se precipite formando um “pellet” no fundo do tubo. O sobrenadante foi, então, removido e o RNA precipitado (“pellet”) lavado com 1 mL de etanol 75%. A mistura foi agitada vigorosamente em Vortex e os tubos novamente centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos, a 4 °C.

O sobrenadante foi aspirado e os tubos contendo os “pellets” de RNA foram deixados abertos para secar no gelo por 5 minutos. Em seguida, o RNA foi redissolvido utilizando 16 µL de água de dietilpirocarbonato (DEPC), livre de RNase. Para facilitar a dissolução, cada tubo foi colocado em “banho-maria” pré-aquecido a 55 °C por 6 minutos. Tanto a qualidade quanto a quantidade do RNA total extraído foram analisados por espectrofotômetro (BioTek® Instruments, Winooski, VT, EUA) em uma placa própria para RNA, a partir de 2 µL de cada amostra. A quantidade encontrada de RNA foi dada em ng/µL com auxílio da leitora de placas e do programa Gen5™ (BioTek® Instruments).

4.4.2 Síntese do Ácido Desoxirribonucléico complementar (cDNA)

Após quantificado o RNA, em tubos de 0,2 mL devidamente identificados, procedeu-se a diluição das amostras para síntese do cDNA em quantidade total de 14 µL. Cada amostra foi diluída em água DEPC de forma que a quantidade total de RNA presente fosse de 500 ng em cada uma. Seguindo o protocolo do fabricante (SuperScript VILO cDNA Synthesis, Invitrogen), 4 µL do 5x VILO Reaction Mix e 2 µL do 10x SuperScript Enzyme Mix foram acrescentados aos 14 µL das amostras diluídas. Os tubos foram levados na máquina de termociclagem (iCycle, BIO-RAD, Hercules, CA, EUA) para incubação em 25 °C por 10 minutos, 42 °C por 60 minutos e 85 °C por 5 minutos. O cDNA obtido foi tratado com RNase H com a finalidade de degradar todos e quaisquer RNAm que serviram de molde para a síntese do cDNA, eliminando qualquer contaminação cruzada com o RNAm.

4.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)

Subsequentemente, para a reação de PCR em tempo real, utilizou-se 3,1 µL do cDNA de cada amostra diluído em 31,77 µL de água DEPC. Após diluição, 11,25 µL do cDNA de cada amostra foi acrescentado em uma placa de 96 poços própria para RT-PCR. Os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) para os genes *Runx2*, *ALP* e *BSP* foram preparados, bem como o “primer” para o gene endógeno constitutivo *GAPDH*, que serviu de controle interno. Para o *Runx2*, 312,5 µL do TaqMan Master Mix (TaqMan® Universal PCR Master Mix, AmpErase® UNG, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) foi diluído em 31,25 µL do “primer” para o gene *Runx2*. As mesmas quantidades foram utilizadas para o “primer” dos genes *ALP* e *BSP*. Já para o *GAPDH*, 312,15µl do TaqMan Master Mix foi misturado com 6,25µl de “forward primer”, 6,25µl de “reverse primer”, 6,25µl de “probe” e 12,5µl de água DEPC. Para as amostras de dosagem do gene *Runx2*, 13,75µl do Master Mix que foi preparado acima foi acrescentado nos poços contendo 11,25µl das amostras, perfazendo um volume total de 25µl/poço. O mesmo foi repetido para as amostras utilizadas

para a dosagem dos outros genes. A placa foi, então, cuidadosamente coberta com um plástico e centrifugada.

A leitura do PCR foi realizada utilizando termociclador ABI prisma 7000 para PCR em tempo real (Applied Biosystems). A programação do termociclador, de acordo com as recomendações do “primer”, foi: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C. O Software do termociclador foi utilizado para calcular o valor do ciclo limiar (Ct – “Cycle Threshold”) para todos os genes em cada amostra. Os valores de Ct dos genes de interesse, *Runx2*, *ALP* e *BSP*, foram normalizados para o gene *GAPDH*.

Para o cálculo da quantidade relativa das transcrições nas amostras, utilizou-se o método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Neste método, o Ct do gene de interesse (*Runx2*, *ALP* e *BSP*) é subtraído pelo Ct do controle interno (*GAPDH*), resultando em um ΔCt . Em seguida, o ΔCt de cada gene é subtraído pelo ΔCt do grupo controle (Screw 3 dias), gerando o $\Delta\Delta Ct$. É este valor que será usado na fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os números finais são apresentados como o número de vezes que o gene de interesse foi mais expresso comparado ao grupo controle usinado 3 dias.

4.5 Dosagem dos fatores de crescimento

Os sobrenadantes previamente coletados e congelados foram utilizados para dosagem dos níveis de BMP-2 e TGF- β 1 pelo método ELISA Sanduíche. Para tanto, foi utilizado o kit comercial “Human BMP-2 ELISA Development Kit” (900-K255, Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA), para dosagem de BMP-2, e o kit comercial “Human TGF- β 1 ELISA Ready-SET-Go![®]” (88-7344, e-Bioscience, San Diego, CA, EUA), para dosagem de TGF- β 1. Os ensaios foram realizados conforme recomendações dos fabricantes, em triplicata.

Brevemente, microplacas de 96 poços (Corning Incorporated) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de anticorpo de captura, para os respectivos fatores de crescimento, e incubadas “overnight” à temperatura ambiente (BMP-2) e “overnight” a 4 °C (TGF-β1). Após a incubação, as placas foram lavadas com PBS-T 0,05% e bloqueadas com solução de bloqueio (300 µL para BMP-2 e 200 µL para TGF-β1, por poço) por 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram novamente lavadas. Para BMP-2, 100 µl das amostras testes, bem como dos padrões, foram adicionados aos poços e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Para TGF-β1, após a adição de 100 µL/poço das amostras testes, foi realizada ativação das formas latentes de TGF-β1 em imunorreativas por meio de acidificação com 20 µL/poço de HCl 1N (10 minutos), seguida da neutralização com 20 µL/poço de NaOH 1N. Só então, foram adicionados 100 µL/poço do padrão de TGF-β1 à placa para incubação da mesma “overnight” a 4 °C. Após os respectivos períodos de incubação, as placas para BMP-2 e TGF-β1 foram lavadas e 100 µl de anticorpo de detecção adicionados para incubação por 2 horas (BMP-2) e 1 hora (TGF-β1) em temperatura ambiente, com posterior lavagem. Em seguida, cada poço de ambas as placas recebeu 100 µL de Avidina-Peroxidase sendo as mesmas incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, protegidas da luz. Após nova lavagem das placas, os substratos enzimáticos ABTS (BMP-2) e TMB (TGF-β1) foram adicionados na quantidade de 100µL/poço. As placas foram incubadas por 50 minutos (BMP-2) e 15 minutos (TGF-β1) para desenvolvimento de cor. Somente para TGF-β1, a reação foi interrompida com a adição de 50 µL/poço de H₂SO₄ 2N.

A densidade óptica foi determinada em leitor de microplacas (Instrutherm Espectrofotômetro UV-2000A) a 405nm (BMP-2) e a 450nm (TGF-β1). A concentração correspondente a cada valor de densidade óptica foi determinada de acordo com a concentração conhecida das curvas de regressão linear obtida pelos respectivos padrões dos fatores de crescimento em questão.

4.6 Análise estatística

A estatística descritiva foi calculada utilizando o software SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, EUA). Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade de variâncias (Levene). Os parâmetros de viabilidade celular após 3 dias e dosagem de TGF- β 1 em 14 dias foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis. As comparações dos valores de viabilidade celular após 7 e 14 dias, dosagem de BMP-2 e dosagem de TGF- β 1 após 3 e 7 dias foram realizadas pela Análise de Variância univariada (ANOVA one-way), seguida pelo teste de Tukey quando necessário. A análise da expressão gênica foi realizada por meio do teste *t* de Student para comparação dos níveis de RNAm dos grupos experimentais em relação ao grupo controle usinado - Screw 3 dias (Yuan et al., 2006; Wescott et al., 2007). A influência que cada uma das três superfícies teve sobre a associação dos níveis de secreção de fatores de crescimento com os níveis de expressão de *Runx2*, bem como sobre os níveis de expressão deste fator de transcrição com genes ALP e BSP foi testada por meio da Correlação de Pearson. Para todas as análises estatísticas, o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Viabilidade celular

Os resultados relacionados à viabilidade celular mostraram maiores níveis de absorvância para Porous e Vulcano em todos os tempos experimentais (Figura 2). Ainda assim, nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada entre as superfícies avaliadas após 3 dias ($p=0,540$, Figura 2A). Aos 7 dias, houve aumento significativo na viabilidade celular para Porous e Vulcano quando comparados com o grupo controle ($p=0,005$, Figura 2B), mas sem diferenças estatísticas entre si ($p=0,995$). Diferentemente, aos 14 dias, Porous apresentou diferenças estatísticas significantes quando comparado aos outros grupos ($p<0,001$; Figura 2C), apresentando os maiores valores de viabilidade. Em todos os momentos da cultura, Screw teve os menores valores de absorvância. Ao longo do tempo (Figura 2D), é possível observar que de maneira geral a viabilidade celular aumentou em 7 dias e reduziu após 14 dias de cultura para todas as superfícies estudadas, exceto Screw.

5.2 Análise da expressão gênica

Os resultados obtidos mostraram que o tratamento de superfície influenciou os níveis de expressão para os três genes avaliados (Figura 3). Uma observação geral foi que os níveis de expressão dos genes em estudo nos períodos de 3 e 14 dias foram sempre menores do que os observados em 7 dias. Aos 3 e 14 dias, não houve diferença estatística na expressão gênica entre as superfícies avaliadas em relação à superfície controle Screw 3 dias para todos os genes. No entanto, após 7 dias, todas as superfícies apresentaram aumento significativo nos níveis de RNAm dos três genes quando comparados a Screw 3 dias.

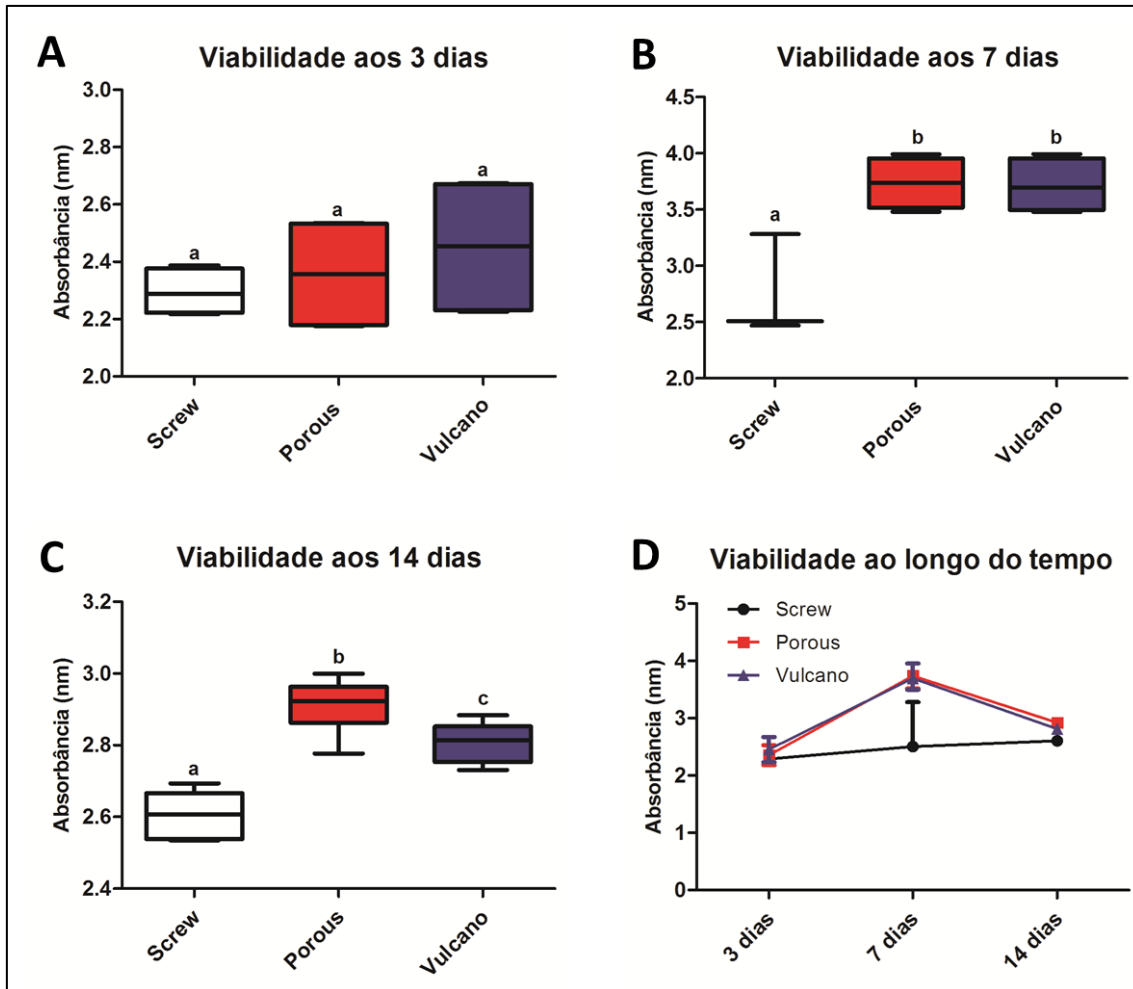


Figura 2. Viabilidade das células hFOB 1.19 sobre as superfícies Screw (usinada), Porous (ataque ácido) e Vulcano (anodizada com CaP) após 3 (A), 7 (B) e 14 (C) dias de cultura. Os boxplots representam a mediana e os dados distribuídos em quartis. A viabilidade celular ao longo do tempo está representada em (D). Cada ponto do gráfico representa a mediana dos níveis de absorbância com a respectiva distribuição interquartil. Letras iguais indicam diferenças estatísticas não significativas entre os grupos

Os níveis de expressão relativo do gene *Runx2* (Figura 3A) mostraram que, aos 3 dias, o grupo Vulcano apresentou induções 2,5x e 1x maiores do que os grupos Screw (controle) e Porous, respectivamente. Após 7 dias, Porous, Vulcano e Screw apresentaram aumentos significativos de 12,5x, 8,6x e 5,8x, respectivamente, comparados ao controle (usinado). Já aos 14

dias, a expressão relativa do gene *Runx2* teve uma acentuada redução para todos os grupos a níveis menores que os encontrados em Screw 3 dias.

Os níveis relativos de expressão do RNAm para o gene *ALP* (Figura 3B) apresentaram-se elevados para o grupo Vulcano com uma indução 2x maior após 3 dias e 8,1x maior após 7 dias, comparados com a superfície usinada. A superfície Porous apresentou valores não tão elevados com 3 e 7 dias, 1x e 7,6x, respectivamente. A superfície Screw, após 7 dias, apresentou indução 4,8x maior comparada ao controle. Aos 14 dias, também ocorreu acentuado declínio nos níveis de expressão de *ALP* em todos os grupos.

Os níveis relativos de expressão do gene *BSP* (Figura 3C) aos 3 dias também foram favoráveis à superfície Vulcano (2,1x maior), seguida da superfície Porous (1,7x maior) em comparação a Screw 3 dias. Entretanto, após 7 dias, Porous aumentou significativamente a expressão de *BSP* (13,4x), seguida de Vulcano e Screw (6,9 e 6,2x, respectivamente) quando comparados ao controle. Aos 14 dias, assim como ocorreu na expressão dos outros genes em estudo, houve queda a níveis basais nos níveis relativos de RNAm para todos os grupos.

5.3 Dosagem dos fatores de crescimento

O tipo de superfície sobre a qual as células hFOB 1.19 foram cultivadas não influenciou significativamente a secreção de TGF- β 1 e BMP-2 em todos os períodos experimentais (Figura 4). Em geral, não houve um padrão de secreção comum entre os dois fatores para as mesmas superfícies. Os níveis de TGF- β 1 tenderam a ser maiores para Screw aos 3 dias e para Porous aos 7 e 14 dias (Figura 4A). Já a secreção de BMP-2 teve maior tendência para Screw em 3 e 7 dias e para Porous aos 14 dias (Figura 4B).

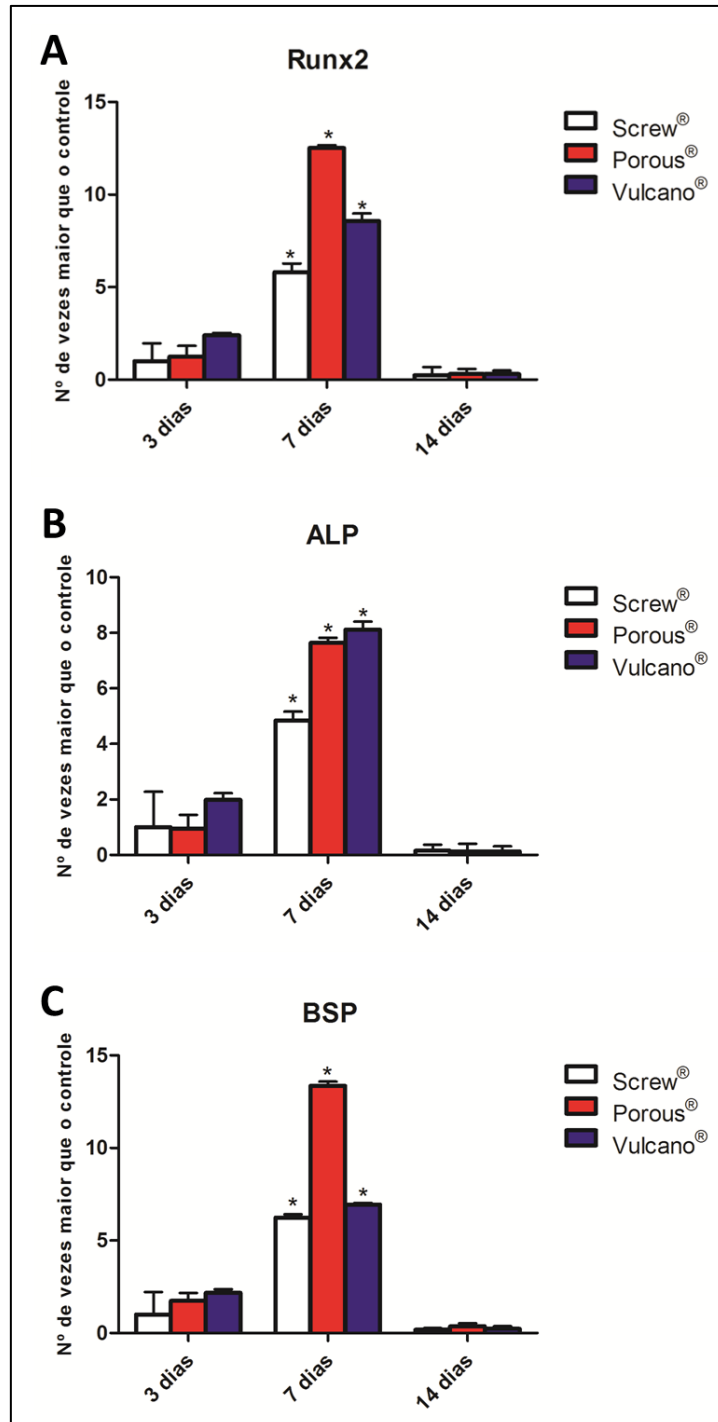


Figura 3. Níveis de expressão dos genes *Runx2* (A), *ALP* (B) e *BSP* (C) nos períodos de 3, 7 e 14 dias de cultura sobre as superfícies Screw (usinada), Porous (ataque ácido) e Vulcano (anodizada com CaP). Os resultados são apresentados como nível de expressão relativo ao grupo controle - Screw 3 dias (Método $2^{-\Delta\Delta C_t}$). *Diferenças estatísticas significantes quando comparadas a superfície usinada em 3 dias ($p < 0,05$).

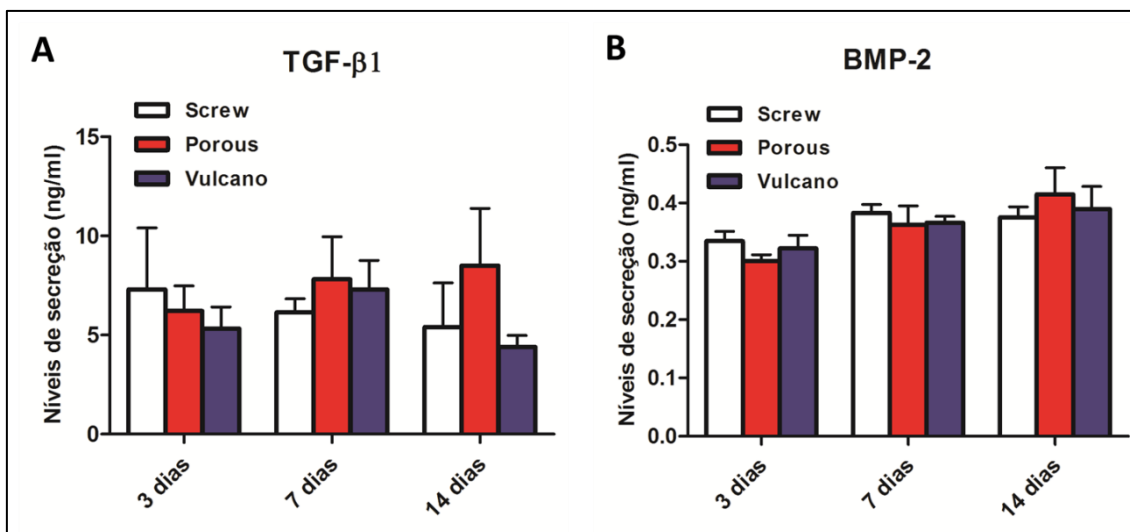


Figura 4. Níveis de TGF-β1 (A) e BMP-2 (B) secretados pelas células hFOB 1.19 cultivadas sobre as superfícies Screw[®] (usinada), Porous[®] (ataque ácido) e Vulcano[®] (anodizada com CaP) após 3, 7 e 14 dias. Valores representados pela média ±DP.

5.4 Associação entre fatores de crescimento vs. *Runx2* e entre *Runx2* vs. *ALP/BSP*

A influência que cada tratamento de superfície teve sobre a associação dos níveis de secreção de BMP-2/TGF-β1 com os níveis de expressão de *Runx2*, assim como sobre a associação de *Runx2* com a expressão de *ALP/BSP* estão representados na Tabela 2. Não houve correlação significativa entre a secreção de fatores de crescimento e a expressão de *Runx2* para nenhum tipo de superfície estudada ($p > 0,05$), exceto entre TGF-β1 vs. *Runx2* para a superfície Vulcano ($p = 0,0027$). Diferentemente, independente do tipo de tratamento, houve correlação positiva significativa entre a expressão de *Runx2* e a expressão de *ALP/BSP* ($p < 0,0001$). Isto sugere que a expressão destas proteínas da matriz óssea pode ser dependente da expressão de *Runx2*.

Tabela 2. Correlação de Pearson entre a expressão de *Runx2* e variáveis possivelmente associadas (fatores de crescimento e proteínas da matriz óssea)

	Screw		Porous		Vulcano	
Variáveis	r	p-value	r	p-value	R	p-value
TGF- β 1	0,0356	0,9272	0,068	0,8620	0,8637	0,0027*
BMP-2	0,0919	0,8141	0,1842	0,6352	-0,2003	0,6054
<i>ALP</i>	0,9793	<0,0001*	0,9982	<0,0001*	0,9968	<0,0001*
<i>BSP</i>	0,9739	<0,0001*	0,9901	<0,0001*	0,9542	<0,0001*

(r) coeficiente de correlação de Pearson; (*) Estatisticamente significativa

6. Discussão

Diversos estudos já haviam confirmado a influência da combinação da técnica de anodização com adição de Ca e P sobre as respostas iniciais de osteoblastos, tais como adesão (Takebe et al., 2000; Huang et al., 2007) e proliferação celulares (Suh et al., 2003; Zhang et al., 2004; Li et al., 2005; Lee et al., 2010; Kim et al., 2011). Entretanto, o efeito da anodização com CaP sobre a expressão de genes-chave envolvidos na diferenciação de osteoblastos, assim como sobre a secreção de fatores de crescimento por estas células, encontra-se pouco esclarecido. O presente estudo avaliou a influência de três superfícies de implante comercialmente disponíveis sobre a resposta de osteoblastos humanos imortalizados. Os resultados obtidos demonstraram que o processo de osteogênese *in vitro* é influenciado pela interação célula-superfície. Entretanto, a hipótese proposta foi rejeitada.

A viabilidade celular ao longo do tempo sugere que houve um aumento significativo na taxa de proliferação celular entre 3 e 7 dias para as superfícies Porous e Vulcano. As absorbâncias similares entre os dois grupos aos 7 dias indica que as células possivelmente atingiram a confluência, resultando em parada na proliferação para o início da diferenciação. Isso se confirma pelo decréscimo da viabilidade aos 14 dias para esses grupos, provavelmente por desadesão das células por falta de espaço para se proliferar. Segundo Boyan et al. (1998) e Lincks et al. (1998), células cultivadas em superfícies rugosas tendem a exibir características de osteoblastos mais diferenciados, incluindo redução da proliferação celular. Certamente, se o tempo experimental de 5 dias fosse avaliado, diferenças na taxa de proliferação entre as superfícies Porous e Vulcano seriam mais pronunciadas. Ainda assim, a maior viabilidade celular observada nos grupos Porous e Vulcano em todos os tempos experimentais indica que superfícies mais rugosas e hidrofílicas têm maior afinidade com os osteoblastos e que, portanto, seriam mais biocompatíveis. Esta observação está em acordo com estudos anteriores (Lee et al., 2010; Pae et al., 2011; Lin et al., 2012).

Apesar do decréscimo da proliferação celular para todos os grupos aos 14 dias, Porous ainda conseguiu se manter com uma significativa taxa de viabilidade comparada aos outros grupos. Provavelmente, o aumento

acentuado da concentração de Ca^{2+} e HPO_4^{2-} no meio extracelular ao longo do tempo para o grupo Vulcano, pode ter causado a morte dos osteoblastos (Adams et al., 2001). Em uma situação *in vivo*, a atividade osteoclástica certamente teria balanceado a taxa de dissolução desses íons (Salgado et al., 2004), ativando osteoblastos a iniciar a deposição de matriz óssea (Lavenus et al., 2010). Desta maneira, os benefícios de superfícies bioativas com CaP dependem da estabilidade e taxa de dissolução desta cobertura (Liu et al., 2008; Müller et al., 2008; Coelho et al., 2009) e a determinação das taxas de degradação/dissolução são difíceis de se prever em um estudo *in vitro*.

A viabilidade e proliferação celulares são parâmetros chaves, juntamente com a adesão celular, para o início da regeneração tecidual. Uma vez aderidas ao substrato, as células começam a se proliferar, para então iniciarem o processo de diferenciação e maturação celular (Lavenus et al., 2010). Nesta etapa, marcadores osteogênicos específicos tais como fatores de transcrição (*Runx2*, *Osterix*) e proteínas não colágenas (fosfatase alcalina - ALP, osteopontina - OPN, osteocalcina - OCN, sialoproteína óssea - BSP) são importantes para avaliar a progressão temporal da osteogênese sobre biomateriais (Hidalgo-Batista e Cartmell, 2010). Considerando que nem toda mensagem (RNA) será traduzida em uma proteína (Wescott et al., 2007), a análise da expressão gênica mostra-se como uma ferramenta importante na detecção precoce destes marcadores.

Runx2 é um fator de transcrição essencial para a diferenciação osteoblástica, sendo fortemente detectado em pré-osteoblastos, osteoblastos imaturos e em osteoblastos recém-maturados (Komori, 2010). O aumento significativo na expressão de *Runx2* após 7 dias, sugere o início da determinação do fenótipo maduro para os osteoblastos hFOB 1.19. Este resultado está em desacordo com os obtidos por Setzer et al. (2009), os quais observaram, após 3 dias de cultura, uma regulação positiva significativa para *Runx2* em hFOB 1.19 cultivados sobre superfícies rugosas. No presente estudo, após 3 dias de cultura, somente as células cultivadas sobre Vulcano apresentaram maior tendência a expressar *Runx2*, indicando que essa

superfície tem um efeito positivo na diferenciação precoce dos osteoblastos. No entanto, deve-se levar em consideração as diferenças metodológicas entre as duas pesquisas em relação às condições de cultura (suplementos, temperatura, densidade celular), bem como os tipos de superfícies analisadas (superfícies de titânio, zircônia e alumina modificadas) por Setzer et al. (2009).

A redução da expressão de *Runx2* a níveis basais em 14 dias, confirma estudos anteriores (Liu et al., 2001; Geoffroy et al., 2002) de que a função positiva de *Runx2* está confinada aos estágios iniciais da diferenciação. Uma vez que *Runx2* inibe o estágio final da maturação de osteoblastos, sua regulação negativa é necessária para a diferenciação em osteoblastos maduros (Komori, 2010). Contrariamente, Mendonça et al. (2010) demonstraram aumento significativo nos níveis de *Runx2* após 14 dias de cultivo em superfícies submetidas ao ataque ácido e superfícies jateadas. A diferença nos resultados pode ser atribuída ao modelo de cultura utilizado pelos autores, os quais realizaram o experimento com células tronco-mesenquimais humanas (hMSCs). De acordo com Mendonça et al. (2011) esse tipo celular requer mais etapas até que se diferencie em osteoblastos maduros (por volta de 21 a 35 dias) do que uma linhagem de células osteoprogenitoras, como as que foram utilizadas no presente trabalho.

Além do papel essencial de direcionamento de células precursoras de osteoblastos para a linhagem osteoblástica, *Runx2* está relacionado com a regulação da expressão de genes que codificam proteínas da matriz óssea, incluindo colágeno tipo I (*Col1*), *ALP*, *OCN*, *OPN*, e *BSP* (Stein et al., 2004; Komori, 2010). No presente estudo, foi observado um significativo aumento da expressão de *ALP* e *BSP*, no mesmo tempo experimental em que *Runx2* apresentou níveis elevados (7 dias), seguido de uma diminuição acentuada em 14 dias, possivelmente relacionada também com *Runx2*. Esta forte associação foi confirmada pela significativa correlação positiva entre esses genes, independentemente do tipo de superfície. Assim, especula-se que níveis maiores de *Runx2* favorecem sua ligação às regiões promotoras de *ALP* e *BSP* resultando em maior expressão destes genes. Em acordo com esses

resultados, Mendonça et al., (2010) demonstraram que um aumento nos níveis de expressão de *Runx2* está relacionado com aumento na expressão de *ALP* e *BSP* em superfícies usinadas e jateadas (seguidas ou não de ataque ácido). Apesar do consenso de que *Runx2* é um regulador positivo de *ALP* (Harada et al., 1999; Harada et al, 2003, Komori, 2010), alguns estudos indicam que a expressão de *BSP* pode ser inibida pelo aumento de *Runx2* (Javed et al., 2001; Lamour et al., 2007), dependendo do tipo de cofator recrutado para regulação de sequências específicas do DNA (Lamour et al., 2007).

A fosfatase alcalina é considerada um marcador inicial da mineralização e da diferenciação das células osteogênicas em fenótipo de osteoblasto (Davies, 2003; Park et al., 2008) . Desse modo, o decréscimo dos níveis de *ALP* após um acentuado aumento em 7 dias, era esperado. Park et al. (2008) também encontrou níveis altos de expressão de *ALP* em 7 dias, seguido por um acentuado declínio em 14 dias, para superfícies jateadas com biocerâmica reabsorvível (RBM) e cobertura de cálcio. Os autores concluíram que a modificação química da superfície favoreceu a diferenciação de pré-osteoblastos, o mesmo ocorrendo no presente estudo para o grupo Vulcano, que teve os maiores níveis de *ALP* aos 3 e 7 dias.

Já a sialoproteína óssea é considerada um marcador tardio da diferenciação celular, estritamente relacionado com tecidos mineralizados (Lamour et al., 2007). O aumento da expressão de *BSP* concomitante ao de *ALP* após 7 dias, reforça que as células estão se diferenciando em osteoblastos maduros e que estes estão sintetizando matriz óssea, essencial para a formação de um novo tecido ósseo. No entanto, esperava-se que a manutenção ou mesmo um aumento dos níveis de *BSP* em 14 dias ocorresse, o que não aconteceu. De Oliveira e Nanci (2004) e De Oliveira et al. (2007) também observaram aumento na expressão de *BSP* inicialmente em células osteogênicas cultivadas sobre nanosuperfícies de titânio, quando comparadas com titânio controle. Considerando que a expressão de marcadores tardios da diferenciação, como *OCN* e *BSP*, é um processo que requer Osterix (*OSX*) (Nakashima et al., 2002; Stein et al., 2004; Takagi et al., 2004), isso levanta um

questionamento sobre a modulação dependente da diferenciação osteoblástica por este outro fator de transcrição. Embora não avaliado nesse estudo, sugerimos uma possível relação entre baixa expressão de *OSX* em 14 dias e redução acentuada nos níveis de *BSP* no mesmo período. Certamente, avaliações em períodos mais longos de cultura poderiam demonstrar aumento nos níveis de *BSP* concomitantes a aumento nos níveis de *OSX*.

Além da importância de se investigar as interações celulares com biomateriais no tocante aos eventos de viabilidade, proliferação e expressão de genes que regulam a diferenciação osteoblástica, fatores de crescimento sintetizados pelos próprios osteoblastos também podem influenciar o processo de reparo. O caminho de diferenciação que um osteoblasto irá seguir, por exemplo, depende de moléculas sinalizadoras como BMPs e TGF- β , que regulam a expressão de genes-mestres nas células osteoprogenitoras (Zarb et al. 2002; Watzek, 2004).

Em relação à superfamília do TGF- β e sua influência na expressão gênica, estudos utilizando células mesenquimais pluripotentes (C2C12) (Lee et al., 2000) e linhagem de células osteoprogenitoras ROB-C26 (C26) (Takagi et al., 2004) tratadas com BMP-2 e TGF- β 1 têm demonstrado que a expressão de *Runx2* está sob a regulação desses fatores de crescimento. No presente estudo, apenas a secreção de TGF- β 1 foi significativamente correlacionada com a expressão de *Runx2* na superfície Vulcano. Para todos os outros grupos, BMP-2 e TGF- β 1 não tiveram um padrão similar de secreção que pudesse ser positivamente ou negativamente correlacionado com *Runx2*, de maneira significativa. Estes resultados contraditórios podem ser devido ao fato de, diferentemente dos estudos anteriores, o meio de cultura neste trabalho não foi suplementado com fatores de crescimento, o que pode ter tornado a modulação da expressão de *Runx2* menos expressiva. Esperava-se que BMP-2/TGF- β 1 secretados pelas próprias células fossem capazes de afetar significativamente a expressão de *Runx2* via estimulação autócrina e parácrina, o que aconteceu apenas em Vulcano para TGF- β 1 vs. *Runx2*. Além do mais, não houve um aumento significativo na secreção de BMP-2/TGF- β 1 em

superfícies lisas ou rugosas. Contrariamente, estudos *in vitro* (Lincks et al., 1998; Boyan et al., 2003; Moura, 2009) e *in vivo* (Shierano et al., 2005) encontraram maior síntese de TGF- β 1 em superfícies mais rugosas quando comparadas a superfícies mais lisas.

É esperado que substratos contendo coberturas de CaP promovam uma resposta osteoblástica mais rápida, favorecendo a osseointegração, quando comparados com aqueles sem cobertura de CaP (Quaranta et al., 2010). No presente estudo, a incorporação de CaP pelo método da anodização modulou positivamente os eventos biológicos relacionados com a osteogênese *in vitro* apenas no período intermediário de 7 dias. Vários são os parâmetros de superfícies com revestimentos de fosfato de cálcio que afetam a atividade celular, e que podem ter sido responsáveis pelo não favorecimento de eventos tardios. São eles, dissolução, composição, topografia e energia de superfície (Barrère et al., 2006). A dissolução das coberturas de CaP depende da natureza do fosfato de cálcio formado (se hidroxiapatita, fosfato tricálcio, fosfato de octacálcio, fosfato de cálcio amorfo, etc) (Lu et al., 2002). Este, de acordo com sua concentração, interfere na proliferação, diferenciação e maturação dos osteoblastos, podendo causar até a morte celular (Hyakuna et al., 1989). Mudanças na proporção de cálcio e fósforo em uma biocerâmica significa alteração na composição da fase e consequentemente um efeito direto nos mecanismos de trocas iônicas (Barrère et al., 2006), podendo aumentar ou diminuir a proliferação celular. A forma do cristal de fosfato de cálcio, se maior ou menor, pode afetar a expressão de proteínas não colágenas da matriz (Chou et al., 2005). E, por fim, a energia de superfície, relacionada com a topografia, parece afetar fortemente eventos iniciais de proliferação e função dos osteoblastos, mas não influenciar eventos tardios (Redey et al., 2000).

Provavelmente, a ausência de parâmetros como dissolução, composição da fase e forma do cristal para superfícies apenas fisicamente modificadas, explica o favorecimento nos eventos de viabilidade (aos 7 e 14 dias) e diferenciação (aos 7 dias) para a superfície Porous. Os resultados aqui apresentados são suportados por Le Guéhennec et al. (2007) que concluíram, em sua revisão sobre tratamentos de superfície, que a rugosidade de superfície

melhora a osseointegração, mas que o papel exato da composição e topografia nos eventos iniciais da osteogênese ainda se encontra pouco compreendido. Desta maneira, é importante que superfícies disponíveis comercialmente com modificações químicas, continuem sendo avaliadas para validação do seu uso clínico. Assim, mais estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando co-cultura de osteoblastos, osteoclastos e células mononucleares (a curto, médio e longo prazo) deveriam ser realizados, a fim de que se investiguem, além da expressão, a secreção de proteínas marcadoras da osteogênese, bem como outros fatores de transcrição e citocinas envolvidas no processo de reparo ósseo.

7. Conclusão

De acordo com os objetivos propostos e a metodologia empregada neste estudo, pode-se concluir que:

- A anodização com incorporação de CaP favoreceu os eventos de viabilidade celular e expressão gênica (especialmente de ALP) em períodos intermediários (7 dias), de maneira similar às superfícies que sofreram apenas ataque ácido.
- A secreção de TGF- β 1/BMP-2 parece não ser influenciada pelo tipo de superfície, apesar da incorporação de CaP por anodização favorecer a associação entre a secreção de TGF- β 1 e a expressão de *Runx2*.
- Independentemente do tratamento de superfície, a expressão de *ALP/BSP* está fortemente associada à expressão de *Runx2*.

Os resultados aqui apresentados suportam as observações que a rugosidade pode ter um papel mais importante na determinação da resposta celular do que a composição da superfície.

Referências

1. Adams CS, Mansfield K, Perlot RL, Shapiro IM. Matrix regulation of skeletal cell apoptosis. Role of calcium and phosphate ions. **J Biol Chem.** 2001 Jun;276(23):20316-22.
2. Anselme K, Bigerelle M, Noël B, Dufresne E, Judas D, Iost A, et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. **J. Biomed. Mater. Res.** 2000 Feb;49(2):155-66.
3. Aubin JE. Advance in osteoblast lineage. **Biochem Cell Biol.** 1998;76(6):899-910.
4. Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. **Rev Endocr Metab Disord.** 2001 Jan;2(1):81-94.
5. Barrère F, Blitterswijk CA, Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. **Int J Nanomedicine.** 2006;1(3):317-32.
6. Beloti MM, Rosa AL. Osteoblast differentiation of human bone cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. **Braz Dent J.** 2005;16(2):156-61.
7. Bose S, Roy M, Das K, Bandyopadhyay A. Surface modification of titanium for load-bearing application. **J Mater Sci Mater Med.** 2009 Dec;1:519-24.
8. Boyan BD, Batzer R, Kieswetter K, Liu Y, Cochran DL, Szmuckler-Monclers S, et al. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblastic-like cells to 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$. **J Biomed Mater Res.** 1998 Jan;39(1):77-85.
9. Boyan BD, Lossdörfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann CH, Cochran DL, et al. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. **Eur Cell Mater.** 2003 Oct;6:22-7.
10. Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. **Titanium in medicine: material science, surface science, engineer, biological response and medical applications.** Berlin: Springer; 2001.

11. Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. **J Dent Res**. 2004 Jul;83(7):529-33.
12. Buser D, Mericske-Stern R, Bernard JP, Behneke A, Behneke N, Hirt HP, et al. Long-term evaluation of nonsubmerged ITI implants. Part 1:8-year life table analysis of a prospective multicenter study with 2359 implants. **Clin Oral Implants Res**. 1997 Jun;8(3):161-72.
13. Chou YF, Huang WB, Dunn JCY, et al. The effect of biomimetic apatite structure on osteoblast viability, proliferation, and gene expression. **Biomaterials**. 2005;26:285-95.
14. Coelho PG, Granjeiro JM, Romanos GE, Suzuki M, Silva NR, Cardaropoli G, et al. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. **J Biomed Mater Res Part B**. 2009 Feb;88(2):579-596.
15. Dalle Carbonare L, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G, et al. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. **Micron**. 2005;36(7-8):609-16.
16. Davies JE, Hosseini MM. Histodynamics of endosseous wound healing. In: Davies JE. **Bone engineering**. Toronto: Em squared incorporated; 2000. p.1-14.
17. Davies JE. Understanding Peri-Implant Endosseous Healing. **J Dent Educ**. 2003 Aug;67(8):932-49.
18. De Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials**. 2004 Feb;25(10):403-13.
19. De Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. **J Biomed Mater Res A**. 2007 Mar;80(3):554-64.
20. De Oliveira PT, Zalzal SF, Irie K, Nanci A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. **J Histochem Cytochem**. 2003;51(5):633-41.

21. Declercq HA, Verbeeck RM, De Ridder LI, Schacht EH, Cornelissen MJ. Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. **Biomaterials**. 2005 Aug;26(24):4964-74.
22. Ehrenfest DMD, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry, and topography. **Trends Biotechnol**. 2010 Apr;28(4):198-206.
23. Elias CN, Busquim T, Lima JHC, Muller CA. Caracterização e torque de remoção de implantes dentários com superfície bioativa. **Rev bras odontol**. 2008b;65(2):273-79.
24. Elias CN, Oshida Y, Lima JHC, Muller CA. Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. **J Mech Behav Biomed Mater**. 2008a Jul; 1(3): 234-42.
25. Elias CN. Titanium dental implant surfaces. **Rev Matéria**. 2010;15(2):140-44.
26. Friberg B, Grondahl K, Lekholm U, Branemark PI. Long-term follow-up of severely atrophic edentulous mandibles reconstructed with short Branemark implants. **Clin Implant Dent Relat Res**. 2000;2(4):184-9.
27. Geoffroy V, Kneissel M, Fournier B, Boyde A, Matthias P. High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage. **Mol Cell Biol**. 2002 Sep;22(17):6222-33.
28. Gittens AR, McLachlan T, Olivares-Navarrete R, Cai Y, Berner S, Tannenbaum R, et al. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. **Biomaterials**. 2011 May;32(13):3395-403.
29. Gretzer C, Gisselbalt K, Liljensten E, Ryden L, Thomsen P. Adhesion, apoptosis and cytokine release of human mononuclear cells cultured on degradable poly (urethane urea), polystyrene and titanium in vitro. **Biomaterials**. 2003 Aug;24(17):2843-52.

30. Hansson S. The implant neck: smooth or provided with retention elements. A biomechanical approach. **Clinical Oral Implants Research**. 1999 Oct;10(5):394-405.
31. Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, et al. Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. **J Biol Chem**. 1999 Mar;274(11):6972-8.
32. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**. 2003 May;423 (6937):349-55.
33. Harris SA, Enger RJ, Riggs BL, Spelsberg TC. Development and Characterization of a Conditionally Immortalized Human Fetal Osteoblastic Cell Line. **J Bone and Mineral Res**. 1995 Feb;10(2):178-86.
34. Hidalgo-Bastida LA, Cartmell SH. Mesenchymal stem cells, osteoblasts and extracellular Matrix Proteins: Enhancing cell adhesion and differentiation for bone engineering. **Tissue Eng Part B Rev**. 2010 Aug;16(4):405-11.
35. Huang Y, Wang Y, Ning C, Nan K, Han Y. Hydroxyapatite coatings produced on commercially pure titanium by micro-arc oxidation. **Biomed Mater**. 2007 Sep;2(3):196-201.
36. Hunter Gk, Hauschka PV, Poole AR, et al. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. **Biochem J**. 1996 Jul;317(pt1):59-64.
37. Hyakuna K, Yamamuro T, Kotoura Y, Kakutani T, Takagi H, Oka M, et al. The influence of calcium phosphate ceramics and glass-ceramics on cultured cells and their surrounding media. **J Biomed Mater Res**. 1989; 23(9):1049-66.
38. Ishizawa H, Fujino M, Ogino M. Histomorphometric evaluation of the thin hydroxyapatite layer formed through anodization followed by hydrothermal treatment. **J Biomater Mater Res**. 1997;35(2):199-206.
39. Javed A, Barnes GL, Jasanya BO, Stein JL, Gerstenfeld L, Lian JB, et al. Runt homology domain transcription factors (Runx, Cbfa, and AML) mediate repression of the bone sialoprotein promoter: evidence for

- promoter context-dependent activity of Cbfa proteins. **Mol. Cell. Biol.** 2001;21(8):2891-905.
40. Jonge LT, Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Jansen JA. Organic–Inorganic Surface Modifications for Titanium Implant Surfaces. **Pharmaceutical Research.** 2008 Oct;25(10):2357-69.
 41. Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. **Clin Oral Implants Res.** 2009;20(4):185-206.
 42. Kartisogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. **Mol Cell Endocrinol.** 2004 Dec;228(1-2):79-102.
 43. Kim KH, Ramaswamy N. Electrochemical surface modification of titanium in dentistry. **Dent Mater J.** 2009;28(1):20-36.
 44. Kim MH, Lee SY, Kim MJ, Kim SK, Heo SJ, Koak JY. Effect of Biomimetic Deposition on Anodized Titanium Surfaces. **J Dent Res.** 2011;90(6):711-16.
 45. Komori T, Yage A, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturation arrest of osteoblasts. **Cell.** 1997;89(5):755-64.
 46. Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein enes by RUNX2. **Cell Tissue Res.** 2010;339(1):189-95.
 47. Kubies D, Himmlová L, Riedel T, Chánová E, Balík K, Douděrová M, et al. The Interaction of Osteoblasts With Bone-Implant Materials: 1. The Effect of Physicochemical Surface Properties of Implant Materials. **Physiol Res.** 2011;60:95-111.
 48. Lacefield WR. Current status of ceramic coatings for dental implants. **Implant Dent.** 1998;7:315-22.
 49. Lamour V, Detry C, Sanchez C, Henrotin Y, Castronovo V, Bellahcène A. Runx2- and Histone Deacetylase 3-mediated Repression Is Relieved in Differentiating Human Osteoblast Cells to Allow High Bone Sialoprotein Expression. **J Biol Chem.** 2007;282(50):36240-9.
 50. Lavenus S, Louarn G, Layrolle P. Nanotechnology and Dental Implants. **Int J Biomater.** 2010;2010:915327.

51. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amourig Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dent Mater.** 2007;23:844-854.
52. Le Guenennec L, Lopez-Heredia MA, Enkel B, Weiss P, Amourig Y, Layrolle P. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. **Acta Biomater.** 2008 May;4(3):535-43.
53. Lee JM, Lee JI, Lim YJ. In vitro investigation of anodization and CaP deposited titanium surface using MG63 osteoblast-like cells. **Appl Surf Sci.** 2010;256(10):3086-92.
54. Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, et al. Runx2 is a common target of transforming growth factor β 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between runx2 and smad5 induces osteoblastic-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. **Mol Cell Biol.** 2000;20(23):8783-92.
55. Li LH, Kim HW, Lee SH, Kong YM, Kim HE. Biocompatibility of titanium implants modified by microarc oxidation and hydroxyapatite coating. **J Biomedical Mater Res A.** 2005;73(1):48-54.
56. Li LH, Kong YM, Kim HW, Kim YW, Kim HE, Heo SJ, et al. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. **Biomaterials.** 2004;25(14):2867-75.
57. Lima JHC, Elias CN, Meirelles LAA. A osseointegração em diferentes tipos de superfícies dos implantes osseointegráveis. In: **Odontologia: arte e conhecimento.** São Paulo: Artes Médicas Ltda; 2003. p.353-365.
58. Lin YH, Peng PW, Ou KL. The Effect of Titanium With Electrochemical Anodization on the Response of the Adherent Osteoblast-Like Cell. **Implant Dent.** 2012;21:344-9.
59. Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, et al. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. **Biomaterials.** 1998;19(23):2219-32.
60. Liu H, Yazici H, Ergun C, Webster TJ, 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.** 2008;4(5):1472-9.
61. Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, et al. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. **J Cell Biol.** 2001;155(1):157-66.
 62. Liu X, Chu PK, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Mater. Sci. Eng.** 2004;47:49-121.
 63. Liu X, Lim JY, Donahue HJ, Dhurjati R, Mastro AM, Vogler EA. Influence of Substratum Surface Chemistry/Energy and Topography on the Human Fetal Osteoblastic Cell Line hFOB 1.19: Phenotypic and Genotypic Responses Observed In Vitro. **Biomaterials.** 2007 Nov;28(31):4535-50.
 64. Liu Y, De Groot K, Hunziker EB. Osteoinductive implants: the mise-en-scène for drug-bearing biomimetic coatings. **Ann Biomed Eng.** 2004;32(3):398-406.
 65. Lu J, Descamps M, Dejou J, Koubi G, Hardouin P, Lemaitre J, et al. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. **J Biomed Mater Res.** 2002;63(4):408-12.
 66. Marco F, Milena F, Gianluca G, Vittoria O. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. **Micron.** 2005;36(7-8):630-44.
 67. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. **Biomaterials.** 2007 Nov;28(32):4748-55.
 68. Mendonça DBS, Miguez PA, Mendonça G, Yamauchi M, Aragão FJL, Cooper LF. Titanium surface topography affects collagen biosynthesis of adherent cells. **Bone.** 2011;49(3):463-72.
 69. Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. The combination of micron and nanotopography by H₂SO₄/H₂O₂ treatment and its effects on osteoblast-specific gene expression of hMSCs. **J Biomed Mater Res A.** 2010;94(1):169-9.

70. Millis DR. Bone and non-bone-derived growth factors and effects on bone healing. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** 1999 Sep;29(5):1221-1246.
71. Moura CCG. **A influência do nano-recobrimento de cálcio e fósforo no processo de osteogênese in vitro.** [tese] Uberlândia: Instituto de Imunologia e Parasitologia Aplicadas/UFU; 2009.
72. Mueller CK, Thorwarth M, Schimdt, Schelegel KA, Schultze-Mosgau S. Comparative analysis of osseointegration of titanium implants with acid-etched surfaces and different biomolecular coatings. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2011;112(6):726-36.
73. Müller P, Bulnheim U, Diener A, Lüthen F, Teller M, Klinkenberg ED, et al. Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **J Cell Mol Med.** 2008;12(1):281-91.
74. Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. **Clin Orthop and Relat Res.** 2002 Feb;395:66-80.
75. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell.** 2002;108(1):17-29.
76. Nanci A, McKee MD, Zalzal S, Sakka S. Ultrastructural and immunocytochemical analysis of the tissue response to metal implants in the rat tibia. In: Davidovitch, Z. & Mah, J., eds. **Biological mechanisms of tooth eruption, resorption and replacement by implants.** Boston: Harvard Society for the Advancement of Orthodontics; 1998. p.487-500.
77. Narayanan R, Seshadri SK, Kwon TY, Kim KH. Calcium Phosphate-Based Coatings on Titanium and Its Alloys. **J Biomed Mater Res Part B.** 2008;85(1):279-99.
78. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. **J Cell Physiol.** 1990;143(3):420-30.

79. Pae A, Kim SS, Kim HS, Woo YH. Osteoblast-like cell attachment and proliferation on turned, blasted, and anodized titanium surfaces. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2011;26:475-81.
80. Park JW, Suh JY, Chung HJ. Effects of calcium ion incorporation on osteoblast gene expression in MC3T3-E1 cells cultured on microstructured titanium surfaces. **J Biomed Mater Res A.** 2008;86(1):117-126.
81. Park JY, Davies JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. **Clin Oral Implant Res.** 2000 Dec;11(6):530-9.
82. Pautke C, Schieker M, Tischer T, Kolk A, Neth P, Mutschler W, et al. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. **Anticancer Res.** 2004;24(6):3743-8.
83. Perinpanayagam H, Martin T, Mithal V, Dahman M, Marzec N, Lampasso J, et al. Alveolar bone osteoblast differentiation and Runx2/Cbfa1 expression. **Arch Oral Biol.** 2006;51(5):406-15.
84. Quaranta A, Iezzi G, Scarano A, Coelho PG, Vozza I, Marincola M, et al. A Histomorphometric study of nanothickness and plasma-sprayed calcium-phosphorous-coated implant surfaces in rabbit bone. **J Periodontol.** 2010;81(4):556-61.
85. Redey SA, Nardin M, Bernache-Assolant D, Rey C, Delannoy P, Sedel L, et al. Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: role of surface energy. **J Biomed Mater Res.** 2000;50(3):353-64.
86. Rosa AL, Beloti MM. Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. **Braz Dent J.** 2003;14(1):16-21.
87. Sader MS, Balduino A, Soares Gde A, Borojevic R. Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation. **Clin Oral Impl Res.** 2005 Dec;16(6):667-75.

88. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. **Macromol Biosci**. 2004;4(8):743-65.
89. Schliephake H, Scharnweber D. Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. **J Mater Chem**. 2008;18:2404-14.
90. Schwartz Z, Raz P, Zhao G, Barak Y, Tauber M, Yao H, et al. Effect of micrometer-scale roughness of the surface of ti6al4v pedicle screws in vitro and in vivo. **J Bone Joint Surg Am**. 2008 Nov;90(11):2485-98.
91. Schwartz-Arad D, Laviv A, Levin L. Survival of immediately provisionalized dental implants placed immediately into fresh extraction sockets. **J Periodontol**. 2007 Feb;78(2):219-23.
92. Setzer B, Bächle M, Metzger MC, Kohal RJ. The gene-expression and phenotypic response of hFOB 1.19 osteoblasts to surface-modified titanium and zirconia. **Biomaterials**. 2009;30(6):979-90.
93. Shierano G, Canuto RA, Navone R. Biological factors involved in the osseointegration of oral titanium implants with different surfaces: a pilot study in minipigs. **J Periodontol**. 2005;76(10):1710-20.
94. Stein GS, Lian JB, Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Javed A, et al. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. **Oncogene**. 2004;23(24):4315-29.
95. Subramaniam M, Jalal SM, Rickard DJ, Harris SA, Bolander ME, Spelsberg TC. Further characterization of human fetal osteoblastic hFOB 1.19 and hFOB/ERa cells: bone formation in vivo and karyotype analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization. **J Cell Biochem**. 2002;87(1):9-15.
96. Suh JY, Jang BC, Zhu X, Ong JL, Kim K. Effect of hydrothermal treated anodic oxide films on osteoblast attachment and proliferation. **Biomaterials**. 2003;24(2):347-55.
97. Sul YT, Johansson CB, Petronis S, Krozer A, Jeong Y, Wennerberg A, et al. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide

- thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. **Biomaterials**. 2002a Jan;23(2):491-501.
- 98.Sul YT, Johanssona CB, Roser K, Albrektsson T. Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodised implants. **Biomaterials**. 2002b Apr;23(8):1809-17.
- 99.Sul YT. Johansson C, Byon E, Albrektsson T. The bone response of oxidized bioactive an nonbioactive titanium implants. **Biomaterials**. 2005 Nov;26:6720-6730.
- 100.Sul YT. The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: Special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant. **Biomaterials**. 2003 Oct;24(22):3893-907.
- 101.Takagi M, Kamiya N, Takahashi T, Ito S, Hasegawa M, Suzuki N, et al. Effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor β 1 on gene expression of transcription factors, AJ18 and Runx2 in cultured osteoblastic cells. **J Mol Histol**. 2004;35(1):81-90.
- 102.Takebe J, Itoh S, Okada J, Ishibashi K. Anodic oxidation and hydrothermal treatment of titanium results in a surface that causes increased attachment and altered cytoskeletal morphology of rat bone marrow stromal cell *in vitro*. **J Biomed Mater Res**. 2000;51(3):298-407.
- 103.Termune JD, Kleinman HK, Whiston SW, Conn KM, MCGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. **Cell**. 1981;26:99-105.
- 104.Tomsia AP, Launey ME, Lee JS, Mankani MH, Wegst UG, Saiz E. Nanotechnology Approaches to Improve Dental Implants. **Int J of Oral Maxillo fac Implants**. 2011;26, Suppl:25-44; discussion 45-9.
- 105.Tuan RS. Role of Adult Stem/Progenitor Cells in Osseointegration and Implant Loosening. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2011;26:50-62.
- 106.Tzaphlidou M. The role of collagen in bone structure: animage processing approach. **Micron**. 2005;36(7-8):593-601.
- 107.Watzek, G. **Implants in Qualitatively compromised bone**. Quintessence Publishing Co, Inc. São Paulo, 2004, 181p.

108. Wennerberg A, Albrektsson T, Lindhe J. Surface topography of titanium implants. **In: Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. p.821-25.
109. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. **Clin. Oral Impl. Res.** 2009;4:172-84.
110. Wescott DC, Pinkerton MN, Gaffey BJ, Beggs KT, Milne TJ, Meikle MC. Osteogenic gene expression by human periodontal ligament cells under cyclic tension. **J Dent Res.** 2007;86(12):1212-6.
111. Yan WQ, Nakamura T, Kobayashi M, Kim HM, Miyaji F, Kokubo T (1997) Bonding of chemically treated titanium implants to bone. **J Biomed Mater Res.** 1997 Nov;37(2):267-275.
112. Yang Y, Kim KH, Ong JL. A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process-an alternative to plasma spraying. **Biomaterials.** 2005;26(3):327-37
113. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart Jr CN. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics.** 2006;7:85.
114. Zarb G, Lekholm U, Albrektsson T, Tenenbaum H. **Aging, osteoporosis and dental implants.** Quintessence Publishing Co, Inc. São Paulo, 2002.
115. Zhang YM, Bataillon-Linez P, Huang P, Zhao YM, Han Y, Traisnel M, et al. Surface analyses of micro-arc oxidized and hydrothermally treated titanium and effect on osteoblast behavior. **J Biomed Mater Res A.** 2004;68(2):383-91.
116. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. **J Biomed Mater Res A.** 2005 Jul;74(1):49-58.
117. Zhao G, Zinger O, Schwartz Z, Wieland M, Landolt D, Boyan BD. Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure. **Clin Oral Implants Res.** 2006 Jun;17(3):258-64.