FABIANO RIBEIRO CIRANO

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUPERFÍCIES DE TITÂNIO NA
ADESÃO, PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS
SEMELHANTES A OSTEOLASTOS DE RATOS (OSTEO-1) EM
CULTURAS, NA PRESENÇA OU NÃO DA PROTEÍNA
MORFOGENÉTICA ÓSSEA RECOMBINANTE-2 (rhBMP-2)**

São Paulo

2007

Fabiano Ribeiro Cirano

**Influência de diferentes superfícies de titânio na adesão,
proliferação e diferenciação de células semelhantes a osteoblastos
de ratos (osteo-1) em culturas, na presença ou não da proteína
morfogenética óssea recombinante-2 (rhBMP-2)**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Pugliesi
Alves de Lima

São Paulo

2007

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Cirano, Fabiano Ribeiro

Influência de diferentes superfícies de titânio na adesão, proliferação e diferenciação de células semelhantes a osteoblastos de ratos (osteo-1) em culturas, na presença ou não da proteína morfogenética óssea recombinante-2 (rhBMP-2) / Fabiano Ribeiro Cirano; orientador Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima. -- São Paulo, 2007.

84p. : fig., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Periodontia) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Implantes dentários – Superfícies de titânio – Influência 2. Periodontia
3. Proteínas morfogenéticas ósseas

CDD 617.632
BLACK D64

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cirano FR. Influência de diferentes superfícies de titânio na adesão, proliferação e diferenciação de células semelhantes a osteoblastos de ratos (osteo-1) em culturas, na presença ou não da proteína morfogenética óssea recombinante-2 (rhBMP-2) [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

São Paulo, ____/____/2007

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a uma pessoa brilhante, a qual amo muito, minha esposa e companheira, Carla, que sempre me incentivou e nunca deixou que eu abandonasse um sonho. Também dedico aos meus filhos, Bruno e Carolina, os quais muitas vezes ficaram sem a companhia do pai, para permitir que ele pudesse crescer profissional e intelectualmente.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus e ao seu filho, Jesus Cristo, por iluminar minha vida e permitir todas as realizações de minha existência.

Agradeço meus pais, Bruno e Ivete, pela minha educação e formação, além do senso de justiça e ética que sem dúvida nenhuma engrandecem o caráter de uma pessoa.

Ao meu nono, Giuseppe, e aos outros avós que não estão mais presentes, o meu sincero obrigado pelo simples fato de apoiar meus estudos de forma incondicional e sempre festejar minhas conquistas.

Muito obrigado, Graziela, minha irmã e amiga das horas mais complicadas da vida, aquela que me ajuda com carinho, amor e muitas vezes tem que deixar sua família de lado para ficar comigo me auxiliando na busca de meus objetivos.

Aos meus segundos pais, Maria Rosa e Augusto, os quais me tratam como filho, me incentivando e torcendo pelo meu sucesso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima, que dentro de sua limitação de tempo, me auxiliou direcionando meus estudos e a elaboração do trabalho, seguindo os mais elevados padrões de conduta em pesquisa.

Muito obrigado, Profa. Dra. Márcia Martins Marques, a qual me ensinou a trabalhar com cultura de células, sempre prestativa e atenciosa nas suas orientações e engrandecendo a qualidade do meu doutorado.

À Adriane Yaeko Togashi, minha amiga de mestrado, pela compreensão e pelo espírito de união em nossa luta por um grande sonho.

Ao Prof. Dr. Francisco Emílio Pustiglioni, professor Titular da Disciplina de Periodontia da FOUSP, que apesar das limitações financeiras do Departamento, acreditou em meu objetivo e ajudou não somente do ponto de vista econômico, mas também com todo o seu conhecimento.

Ao Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira, amigo, que abriu as portas do Laboratório de Bioquímica Oral da FOUSP, não medindo esforços para que este estudo pudesse ser terminado, com companheirismo e incentivo ao longo de toda a jornada.

Obrigado, Douglas Nesadal de Souza, pelas orientações no Laboratório de Bioquímica Oral da FOUSP e pela paciência e disposição, muitas vezes deixando suas tarefas de lado para ajudar.

Aos professores doutores, Adalberto Luiz Rosa e Márcio Mateus Beloti, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da USP, pelo ensino da metodologia do estudo, mas principalmente pela acolhida em sua cidade, de forma humana e

carinhosa, além do vasto conhecimento transmitido de maneira transparente e honesta.

Aos professores e amigos da Disciplina de Periodontia da FOUSP, pela amizade e pela contribuição com seus conhecimentos, extremamente valiosos para a conclusão desta fase de minha vida.

Aos colegas do Laboratório de Cultivo Celular e de Bioquímica Oral pela simpatia e pela forma prestativa que sempre me ajudaram.

Obrigado, Márcia Maria dos Santos, secretária da Disciplina de Periodontia da FOUSP e Vera Lúcia S. C. Almeida, secretária do Departamento de Estomatologia da FOUSP, pessoas maravilhosas e sempre dispostas a me ajudar.

Agradeço principalmente toda minha família e amigos, pelo estímulo no sucesso deste trabalho e pela compreensão em todos os momentos de ausência.

Cirano FR. Influência de diferentes superfícies de titânio na adesão, proliferação e diferenciação de células semelhantes a osteoblastos de ratos (osteo-1) em culturas, na presença ou não da proteína morfogenética óssea recombinante-2 (rhBMP-2) [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

Este estudo analisou a influência de diferentes superfícies de titânio na adesão, proliferação e diferenciação de células semelhantes a osteoblastos de rato (osteo-1) em culturas, na presença ou não da proteína morfogenética óssea recombinante-2 (rhBMP-2). As células osteo-1 foram cultivadas sobre as seguintes superfícies de titânio: 1. superfície lisa, 2. superfície desgastada com partículas de areia e condicionamento ácido (SLA) e 3. superfície desgastada com partículas de areia e condicionamento ácido sob proteção de nitrogênio e armazenadas em solução isotônica de cloreto de sódio (SLActive), na presença ou não de 20 ng/ml de rhBMP-2. Foram analisadas a adesão celular em 24 horas, o conteúdo total de proteínas, o conteúdo de colágeno e a atividade de fosfatase alcalina em 7, 14 e 21 dias e a formação de nódulos calcificados em 21 dias. Os resultados mostraram que a adesão não foi influenciada nem pelo tipo de superfície nem pelo tratamento com rhBMP-2 ($p=0,0936$). Quando relacionamos o conteúdo total de proteínas ao número total de células, percebemos que a proliferação não foi influenciada pelo tipo de superfície de titânio, porém a adição de rhBMP-2 levou a uma redução estatisticamente significativa na superfície SLA aos 21 dias ($p=0,0000$). Em relação à diferenciação, pudemos observar que o tipo de superfície não influenciou o conteúdo total de proteínas, o conteúdo de colágeno e a formação de nódulos calcificados em quaisquer dos períodos analisados. A atividade de fosfatase alcalina somente foi influenciada pelo tipo de superfície aos 14 dias, onde o grupo C/SLActive

apresentou valores inferiores ao grupo C/Liso ($p=0,0000$). A adição de rhBMP-2 promoveu uma maior influência sobre o processo de diferenciação, levando a uma redução estatisticamente significativa no conteúdo total de proteínas na superfície SLA aos 21 dias ($p=0,0000$), a um aumento estatisticamente significativo no conteúdo de colágeno na superfície SLActive no período de 7 dias ($p=0,0005$) e a uma diminuição estatisticamente significativa na atividade de fosfatase alcalina na superfície lisa nos períodos de 14 e 21 dias, na superfície SLA aos 14 dias e na superfície SLActive aos 21 dias ($p=0,0000$). Somente a formação de nódulos calcificados não sofreu influência da adição de rhBMP-2.

Palavras-chave: Proteína morfogenética óssea - Superfícies de titânio – Implantes - Osteoblastos

Cirano FR. Influence of different titanium surfaces in the adhesion, proliferation and differentiation of rat osteoblast-like cells (osteo-1 culture), in the presence or nor of the recombinant bone morphogenetic protein (rhBMP-2) [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

This study has analyzed the influence of different titanium surfaces in the adhesion, proliferation and differentiation of rat osteoblast-like cells (osteo-1 culture), in the presence or not, of the recombinant bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). The osteo-1 cells were grown on the following titanium surfaces: 1. smooth surface; 2. coarse grit-blasted and acid-etched surface (SLA); and 3. coarse grit-blasted and acid-etched surface under nitrogen protection, and stored in sodium chloride isotonic solution (SLActive), in the presence or not, of 20 ng/ml of rhBMP-2. It was analyzed the cell adhesion in 24 hours, the total protein content, the collagen content, and the alkaline phosphatase in 7, 14 and 21-day periods, and also the formation of calcified nodules in 21 days. The results showed that the adhesion was neither influenced by the surface type, nor by the treatment with rhBMP-2 ($p=0.0936$). When we related the total protein content to the total number of cells, we noticed that the proliferation was not influenced by the titanium surface type; however, the addition of rhBMP-2 led to a statistically significant reduction on the SLA surface at 21 days ($p=0.0000$). Concerning the differentiation, we could observe that the surface type did not influence the total content of proteins, the collagen content and the formation of calcified nodules in any of the analyzed periods. The alkaline phosphatase activity was only influenced by the surface type at 14 days, where the group C/SLActive presented lower values than the group C/Smooth ($p=0.0000$). The addition of rhBMP-

2 promoted a bigger influence over the differentiation process, thus leading to a statistically significant reduction in the total protein content on the SLA surface at 21 days ($p=0.0000$), a statistically significant increase in the collagen content on the surface SLActive in the 7-day period ($p=0.0005$), a statistically significant reduction in the alkaline phosphatase activity on the smooth surface in the 14 and 21-day periods, on the SLA surface at 14 days, and on the SLActive surface at 21 days ($p=0.0000$). Only the formation of calcified nodules did not undergo influence of the rhBMP-2 addition.

Keywords: Bone morphogenetic protein - Titanium surfaces – Implants - Osteoblast cells

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Esquema dos 10 campos selecionados por disco para avaliação da formação de nódulos calcificados.....45
- Figura 5.1 - Curva de crescimento das células Osteo-1 em diferentes densidades de plaqueamento, avaliada pelo método de redução do MTT expresso em unidades de MTT/densidade ótica (UMTT/DO), nos períodos de 1, 3, 5, 7 e 10 dias. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em quadruplicata.....47
- Figura 5.2 - Efeito dose-resposta da rhBMP-2 na viabilidade de células Osteo-1, em meio de cultura com diferentes concentrações da rhBMP-2 com troca de meio realizada a cada dois dias, avaliado nos períodos de 1, 3, 5 e 7 dias. Os dados estão expressos em unidades de MTT/densidade ótica (UMTT/DO) e apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em quadruplicata (ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, $p=0,0000$). As letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$).....48
- Figura 5.3 - Efeito das diferentes superfícies de titânio na presença ou não de rhBMP-2 na contagem de células Osteo-1 em 24 horas. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão do experimento realizado em quadruplicata (ANOVA, $p=0,0936$).....49
- Figura 5.4 - Conteúdo total de proteínas produzido pelas células Osteo-1 avaliado aos 7, 14 e 21 dias. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão do experimento realizado em quadruplicata (ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, $p=0,0000$) e expressos em μg proteína/ml. As letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$)50
- Figura 5.5 - Conteúdo de colágeno produzido pelas células Osteo-1 avaliado aos 7, 14 e 21 dias. Os dados estão normalizados pelo conteúdo total de proteínas e apresentados como média $\pm$ erro padrão do experimento realizado em triplicata (ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, $p=0,0005$) e expressos em μg colágeno/mg proteína. As letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$) .51

Figura 5.6 - Atividade de fosfatase alcalina das células Osteo-1 avaliada aos 7, 14 e 21 dias. Os dados estão normalizados pelo conteúdo total de proteínas e apresentados como média $\pm$ erro padrão do experimento realizado em quadruplicata (ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, $p=0,0000$) e expressos em μmol timolftaleína/mg proteína. As letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$).53

Figura 5.7 - Formação de nódulos calcificados pelas células Osteo-1 avaliada aos 21 dias. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão do experimento realizado em quadruplicata (Teste de Kruskal-Wallis, $p=0,0456$) e expressos em porcentagem de área mineralizada. As letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$).....54

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3 PROPOSIÇÃO	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Preparo das amostras	37
4.2 Cultura de células.....	38
4.3 Método da redução do MTT	39
4.3.1 Determinação da densidade celular	40
4.3.2 Determinação da concentração de rhBMP-2	40
4.4 Grupos experimentais	41
4.5 Adesão celular	41
4.6 Análise do conteúdo total de proteína	42
4.7 Análise do conteúdo de colágeno	43
4.8 Análise da atividade de fosfatase alcalina	43
4.9 Análise da formação de nódulos semelhantes a osso	44
4.10 Análise estatística	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Densidade celular	47
5.2 Concentração de rhBMP-2	48
5.3 Adesão celular	49
5.4 Conteúdo total de proteína	49
5.5 Conteúdo de colágeno	51
5.6 Atividade de fosfatase alcalina	52
5.7 Formação de nódulos semelhantes a osso	53

6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXOS	86

1 INTRODUÇÃO

O titânio tem sido eleito como material de escolha para ser utilizado em implantes ortopédicos e dentais (ONG; BESS; BESHÖ, 1999). A topografia da superfície do titânio pode ser modificada através de diferentes tratamentos, como usinagem, jateamento com plasma, desgaste com partículas de areia e/ou condicionamento ácido (COOPER et al., 1999). A qualidade da superfície do implante é um dos seis fatores descritos por Albrektsson et al. (1981), que influenciam a cicatrização tecidual no sítio do implante e, subseqüentemente, afetam a osseointegração.

A rugosidade e a microtopografia podem interferir diretamente na resposta celular, afetando a quantidade e a qualidade do tecido neoformado e, conseqüentemente, o processo de regeneração (SCHWARTZ et al., 1997; LIMA et al., 2003). Osteoblastos cultivados sobre superfícies mais rugosas expressam um fenótipo mais diferenciado (BOYAN et al., 1998; GROESSNER-SCHREIBER; KIESWETTER et al., 1996; TUAN, 1992; LAVOS-VALERETO et al., 2002; MARTIN et al., 1995).

Vários estudos *in vitro* mostraram que a rugosidade superficial do titânio diminui a proliferação de células semelhantes a osteoblastos e aumenta a diferenciação celular através do aumento da atividade de fosfatase alcalina, da síntese de proteínas, da produção de osteocalcina e da formação de nódulos semelhantes a osso (LINCKS et al., 1998; MARTIN et al., 1995; KIESWETTER et al., 1996).

Em muitos estudos *in vivo* (BUSER et al., 1991; CARLSSON et al., 1988; THOMAS; COOK, 1985) as superfícies rugosas produziram uma melhor fixação óssea em comparação com superfícies lisas, sugerindo que essa propriedade superficial poderia ter um efeito direto na adesão, proliferação e diferenciação dos osteoblastos.

Além da alteração na topografia superficial, alguns autores propuseram que uma modificação química da superfície do titânio poderia melhorar a função osteoblástica, em especial, a proteção da superfície desgastada com partículas de areia e submetidas ao ataque ácido (SLA) da contaminação com o ar, através da manutenção desta superfície imersa em solução isotônica de cloreto de sódio (SLActive) (BUSER et al., 2004; FERGUSON et al., 2006; MASAKI et al., 2005; ZHAO et al., 2005).

Apesar de muitos estudos terem apresentado melhores resultados com superfícies de titânio rugosas, existem relatos que mostram que o aumento da rugosidade superficial do titânio não estimulou, ou até diminuiu, a função celular e a formação óssea (ANSELME et al., 2000; ANSELME, 2000; NOTH et al., 1999; VERCAIGNE et al., 1998; ROSA; BELOTI, 2003a, 2003b; WENNERBERG; ALBREKTSSON; ANDERSON, 1996; XAVIER et al., 2003).

A formação óssea é um processo complexo que envolve a migração de células para a superfície do osso, proliferação de células osteoprogenitoras e sua diferenciação em osteoblastos, resultando na secreção abundante de proteínas da matriz óssea, as quais coordenam o processo de mineralização (AUBIN, 1998).

A habilidade da matriz óssea desmineralizada de induzir a formação óssea foi atribuída a uma proteína denominada proteína morfogenética óssea (BMP) (URIST; DELANGE; FINERMAN, 1983; WOZNEY, 1995).

As BMPs possuem função crucial no crescimento e diferenciação de grande variedade de tipos celulares, incluindo os osteoblastos (HANADA; DENNIS; CAPLAN, 1997; KAWASAKI et al., 1998; PULEO, 1997). A rhBMP-2 (proteína morfogenética óssea recombinante-2) promove a maturação de células precursoras em osteoblastos mais diferenciados e aumenta a expressão de genes marcadores osteoblásticos e a formação de nódulos semelhantes a osso em células derivadas da calvária de ratos (HAY et al., 1999). Também promovem a diferenciação de células da medula óssea em células osteoblásticas (BI; SIMMONS; MAINOUS, 1999; FROMIGUE; MARIE; LOMRI, 1998; LECANDA; AVIOLI; CHENG, 1997).

Devido aos seus efeitos benéficos na diferenciação de células ósseas, as BMPs têm sido utilizadas para acelerar a cicatrização ao redor dos implantes ósseos (ASAHINA et al., 1997; HERR et al., 1996; KAWAI et al., 1993; KIRKER-HEAD, 2000; ONG; BESS; BESSHO, 1999).

Poucos estudos investigaram os efeitos da superfície de titânio na resposta celular óssea na presença de proteína morfogenética óssea recombinante 2 (rhBMP-2). Estes sugeriram que a presença de rhBMP-2 pode ser efetiva no aumento da atividade celular sobre superfícies de titânio (BOYAN et al., 2002; ONG et al., 1997; ONG; BESS; BESSHO, 1999). Por outro lado, Van den Dolder et al. (2003) reportaram que a adição de rhBMP-2 ao meio de cultura não afetou a proliferação e a diferenciação de células osteoblásticas sobre superfícies de titânio rugosas.

Devido a pouca informação e a falta de consenso na literatura seria interessante procurar esclarecer melhor o papel das superfícies de titânio em culturas de células osteoblásticas na presença ou não de rhBMP-2.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A estabilidade de implantes dentais depende da integração do material artificial ao tecido ósseo. As propriedades físicas e químicas dos implantes podem influenciar a osseointegração. Apesar do conhecimento da importância desta interface, pouco é conhecido sobre os fatores que promovem a sua formação.

A superfície dos materiais pode influenciar diretamente as respostas celulares, afetando a quantidade e a qualidade do tecido neoformado. A superfície química e a energia determinam o tipo e a orientação da absorção de moléculas, afetando diretamente a adesão celular. A adesão local entre as células e o substrato determina a forma da célula, o que pode resultar na expressão de fenótipos específicos. Os osteoblastos e os condrócitos são sensíveis à composição química e à rugosidade superficial. A resposta celular também depende do desenvolvimento local e do estado de maturação das células. O titânio (Ti) é um dos materiais mais utilizado para a confecção de implantes. As características superficiais necessárias para uma ótima formação óssea ao seu redor ainda estão sob investigação. As respostas celulares iniciais ao Ti incluem adesão celular, proliferação, síntese de proteínas e diferenciação, sendo necessário determinar como as propriedades superficiais dos materiais podem influenciar o desempenho biológico das células. As células são sensíveis às características físicas dos materiais com os quais se contatam, sendo que qualquer tratamento superficial tem potencial para alterar as características superficiais, comprometendo sua biocompatibilidade (BOYAN et al., 1995).

O macro design, fabricação, microtopografia superficial e preparo da superfície determinam as características da superfície dos implantes, podendo determinar o sucesso ou fracasso dos mesmos. As propriedades superficiais podem influenciar os eventos celulares iniciais na interface célula-material. Dentre as várias características que influenciam a interface osso-biomaterial têm-se: composição da superfície, energia superficial, rugosidade superficial e topografia, sendo que todas estas características podem ser modificadas durante a fabricação do implante. A osseointegração é o maior determinante do sucesso dos implantes, sendo que vários fatores contribuem com este processo (BOYAN et al., 1995).

O titânio puro comercial (cpTi) é um dos materiais mais freqüentemente utilizado nos implantes pela sua excelente biocompatibilidade, além de poder ser facilmente preparado de diferentes formas e diversas texturas. A rugosidade superficial e a topografia parecem exercer uma função importante na resposta celular ao material. O fato de que uma variedade de células pode orientar seu próprio crescimento de acordo com as microalterações da superfície suportam o conceito de que as células são sensíveis a microtopografia. As células usam a morfologia do substrato para orientação e migração. O alinhamento das células parece ser inversamente influenciado pela extensão ou largura das ranhuras. Em contraste, o alinhamento das células é diretamente influenciado pela profundidade das ranhuras. Variações na microtopografia também podem afetar a resposta da interface tecidual aos implantes. O tipo de adesão local pode influenciar a forma que as células assumem, influenciando posteriormente a expressão fenotípica (BOYAN et al., 1995).

Muitos estudos *in vitro* passaram a ser realizados com a proposta de verificar a influência das diferentes superfícies de titânio na cultura de células osteoblásticas

(GROESSNER-SCHREIBER; TUAN, 1992; MARTIN et al., 1995; MONTANARO et al., 2002). Entre as células utilizadas nestes estudos, podem ser citadas: osteoblastos da calvária embrionária de pintinhos (GROESSNER-SCHREIBER; TUAN, 1992), osteoblastos da calvária de ratos (KELLER et al., 1994), células do osteossarcoma humano semelhantes a osteoblastos – MG63 (BATZER et al., 1998; BOYAN et al., 1998; KIESWETTER et al., 1996; LOHMANN et al., 1999; MARTIN et al., 1995), osteoblastos da mandíbula bovina fetal (COOPER et al., 1999), células semelhantes a osteoblastos – saos-2 (DEGASNE et al., 1999), osteoblastos de ratos (PERIZZOLO; LACEFIELD; BRUNETTE, 2001) e células da medula óssea humana (DELIGIANNI et al., 2001).

A quantificação das células em contato com os substratos por métodos convencionais envolve algumas dificuldades técnicas. Apenas uma correlação indireta através da medição do conteúdo total de proteínas e de um procedimento baseado na contagem celular, seguido por um duplo tratamento enzimático para detalhar as células oferece resultados plenos (MONTANARO et al., 2002).

As superfícies microtopográficas geralmente descritas nos estudos sobre a influência da rugosidade superficial no comportamento celular podem ser classificadas, da mais lisa para a mais rugosa, em: eletropolida (EP), pré-tratada com ácido nítrico hidrofúorídrico - HF/HNO₃ (PT), com leve desgaste, submetida ao ataque ácido com HCl (ácido clorídrico) e H₂SO₄ (ácido sulfúrico) e lavada (EA), desgastada e submetida ao ataque ácido (CA ou SLA) e jateada com plasma titânio (TPS). Na maioria dos estudos, as células também são cultivadas sobre discos de polietileno (plástico) como controle (KIESWETTER et al., 1996). Superfícies de titânio com rugosidades intermediárias também foram caracterizadas em alguns estudos através de jateamento com areia, jateamento com areia e ataque ácido

(BOYAN et al., 1998), usinada e submetida ao ataque ácido, desgastada ou desgastada e submetida ao ataque ácido (BATZER et al., 1998).

Os osteoblastos aderem às superfícies de titânio e, freqüentemente, cobrem a superfície restante através da proliferação celular. O fenótipo dos osteoblastos é mantido nas células cultivadas sobre o titânio. Estas células, porém, não respondem da mesma maneira em culturas sobre discos de titânio com diferentes rugosidades. Os efeitos da rugosidade superficial do titânio na proliferação e na diferenciação dos osteoblastos constituem objeto de vários estudos.

Os materiais podem levar a diferentes respostas no metabolismo celular e na expressão fenotípica *in vitro*. A rugosidade superficial altera a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos e a produção de matriz *in vitro* (KIESWETTER et al., 1996; SCHWARTS et al., 1997).

Estudos *in vitro* mostram que os osteoblastos exibem maior adesão inicial sobre superfícies de titânio rugosas (BATZER et al., 1998; BOYAN et al., 1998; LOHMANN et al., 1999). Na investigação de Rosa e Beloti (2003a), a adesão de células da medula óssea humana não foi afetada pela rugosidade superficial do titânio.

Parece existir uma relação inversa entre o número de células e a rugosidade da superfície de titânio (KIESWETTER et al., 1996; SCHWARTS et al., 1997; SISK et al., 2001). Células semelhantes a osteoblastos, em culturas sobre superfícies de titânio rugosas, mostram uma diminuição no número de células e nos níveis de proliferação celular (BATZER et al., 1998; BANNISTER et al., 2002; BOYAN et al., 1998; LOHMANN et al., 1999; SCHWARTZ et al., 2001; ROSA; BELOTI, 2003a, 2003b).

Em comparação com a confluência celular no plástico, o número de células é menor nas superfícies mais rugosas (TPS- superfície jateada com plasma de titânio) e é maior nas superfícies mais lisas (EP-eletropolida). Nas superfícies com rugosidade intermediária (FA e CA-condicionadas com ácido clorídrico e sulfúrico) o número de células equivale aos encontrados no plástico (MARTIN et al., 1995).

Todavia, Degasne et al. (1999) mostraram que a proliferação celular foi significativamente maior nas culturas sobre o plástico em comparação com os discos de titânio, sendo os níveis de proliferação maiores nas superfícies rugosas em comparação com as superfícies lisas. Também, Deligiannii et al. (2001), analisando os efeitos da rugosidade superficial da liga de titânio, alumínio e vanádium Ti-6Al-4V na resposta de células da medula óssea humana, verificaram que a adesão celular e a proliferação aumentaram com o aumento da rugosidade.

Os efeitos da rugosidade superficial sobre a proliferação são tempo-dependentes. Nas fases iniciais de cultura, a proliferação é maior nas superfícies lisas (titânio polido), enquanto que nas fases finais, as superfícies rugosas (titânio desgastado e tratado) mostram estimular a proliferação. A maior área de superfície nos materiais rugosos leva a uma diminuição inicial seguida por uma prolongada proliferação (NOTH et al., 1999). Para Rosa e Beloti (2003a, 2003b), a rugosidade superficial parece otimizar tanto as respostas celulares intermediárias como as finais, apesar de não afetar a resposta inicial.

Contrastando com a diminuição na proliferação verificada na maioria dos estudos sobre superfícies rugosas, a atividade da fosfatase alcalina é aumentada, sugerindo que as células em culturas sobre estas superfícies expressam fenótipos mais diferenciados (BATZER et al., 1998; BOYAN et al., 1998; LOHMANN et al., 1999; SISK et al., 2001; ROSA; BELOTI, 2003a, 2003b).

Células semelhantes a osteoblastos (MG63) exibem um aumento na diferenciação quando cultivadas sobre superfícies de titânio rugosas (BANNISTER et al., 2002; SCHWARTZ et al., 2001).

Para Lincks et al. (1998), a rugosidade superficial também aumenta a diferenciação celular, o que parece ser decorrente dos aumentos da atividade da ALP, da produção de osteocalcina e da produção de colágeno nas superfícies rugosas. O aumento da atividade da ALP nas superfícies rugosas também poderia ser um efeito compensatório da diminuição da proliferação dos osteoblastos (KU et al., 2002).

A rugosidade superficial também causou um aumento tempo-dependente na produção de osteocalcina e do conteúdo total de proteínas (ROSA; BELOTI, 2003a, 2003b; SISK et al., 2001).

Por outro lado, o estudo de Martin et al. (1995) mostrou que a atividade da fosfatase alcalina nas células isoladas diminuiu com o aumento da rugosidade.

Para Deligiannii et al. (2001) nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na expressão da atividade da ALP com o aumento da rugosidade superficial. Estes autores mostraram resultados contrários aos encontrados na maioria dos estudos quanto à proliferação celular e a atividade da ALP, entretanto os substratos rugosos mostraram uma quantidade maior de proteínas totais e de fibronectina que as superfícies lisas.

Os osteoblastos respondem à microarquitetura do substrato. Em superfícies lisas, as células aderem e proliferam, mas mostram uma pequena expressão dos marcadores de diferenciação, após a confluência. Quando crescem em superfícies rugosas, com uma rugosidade média (Ra) de 4-7 μ m (micrômetros), a proliferação é reduzida, mas a diferenciação (atividade da ALP e produção de osteocalcina) é

aumentada. Os osteoblastos também respondem aos fatores de crescimento e às citocinas de maneira superfície-dependente. O aumento na diferenciação pode estar relacionado a alterações da adesão celular ao substrato. Quando os osteoblastos crescem em superfícies com tratamento químico ou topografia que diminuem a adesão e proliferação celular, mas aumentam a diferenciação, estas células tendem a aumentar a produção de fatores como o TGF- β 1 (fator de crescimento transformador β 1), o qual promove a osteogênese, enquanto diminui a atividade osteoclástica. Além disso, sobre superfícies rugosas, as células em crescimento alteram tanto sua produção basal de fatores autócrinos como sua habilidade de produzir estes fatores em resposta à regulação hormonal. Pode-se dizer que isso resulta em um aumento na produção de fatores que promovem os estágios iniciais de formação óssea e retardam a reabsorção osteoclástica. As respostas à superfície também dependem do estágio de maturação das células na linhagem osteoblástica. Assim, quando as células se tornam mais maduras, os fatores estimulatórios da rugosidade superficial se tornam mais discretos (BOYAN et al., 2003).

A produção de prostaglandina E_2 (PGE₂) e de fator de crescimento transformador β 1 (TGF- β 1) são aumentadas em culturas de osteoblastos crescendo sobre superfícies de titânio rugosas, mostrando que estes fatores poderiam estar envolvidos na resposta dos osteoblastos à rugosidade superficial (BATZER et al., 1998; BOYAN et al., 1998; BOYAN et al., 2001; LINCKS et al., 1998; LOHMANN et al., 1999; SISK et al., 2001; SCHWARTZ et al., 2001).

Deve-se ressaltar também que a resposta celular óssea aos hormônios sistêmicos é modificada pela rugosidade superficial, aumentando a resposta das células MG63 aos hormônios calciotrópicos, como o 1,25-(OH)₂D₃ – 1,25-

diidroxicolecalcifenol (BATZER et al., 1998; BOYAN et al., 1998; LOHMANN et al., 1999; SCHWARTZ et al., 2001).

O mecanismo que conduz ao aumento de expressão de marcadores fenotípicos de maturação é baseado no fato de que a rugosidade superficial leva a um aumento na produção de citocinas e de fatores de regulação local associados com a diferenciação osteoblástica, como TGF- β 1 e as prostaglandinas. Em particular, as prostaglandinas parecem mediar especificamente alguns efeitos da estrutura superficial e parecem estar envolvidas na resposta de células semelhantes a osteoblastos em ativar substâncias como a $1\alpha,25-(OH)_2D_3$. Existem evidências, ainda, de que a ativação das células osteoblásticas ocorre via fosfolipase A_2 e proteína quinase A (MONTANARO et al., 2002).

Além disso, a síntese da matriz extracelular e a subsequente mineralização são substancialmente aumentadas nas culturas sobre as superfícies rugosas e porosas, sugerindo que as superfícies rugosa e porosa dos implantes de titânio atuam como um substrato natural que permite o crescimento celular/tecidual (BATZER et al., 1998; BOYAN et al., 1998; GROESSNER-SCHREIBER; TUAN, 1992; LOHMANN et al., 1999).

Os osteoblastos também produzem mais nódulos ósseos em culturas sobre superfícies de titânio rugosas em comparação com as superfícies lisas (PERIZZOLO; LACEFIELD; BRUNETTE, 2001).

Estes estudos demonstraram que a rugosidade da superfície altera a proliferação dos osteoblastos, diferenciação e produção de matriz *in vitro*. Sugerem também que a rugosidade superficial dos implantes pode determinar a expressão fenotípica das células *in vivo*.

As características superficiais do implante, particularmente a rugosidade, podem afetar diretamente a reparação tecidual, e subseqüentemente o sucesso dos implantes nos sítios de regeneração pela expressão dos fenótipos osteoblásticos (KIESWETTER et al., 1996; SCHWARTZ et al., 1997).

O modelo da topografia das superfícies do implante comercial pode alterar a cultura de matriz extracelular de osteoblastos e a mineralização, sendo que cada superfície acumula depósitos orgânicos e inorgânicos únicos durante a formação da matriz, sugerindo condições físico-químicas e bioquímicas superfície-dependente (COOPER et al., 1999).

Além da topografia superficial, a composição química também poderia interferir no comportamento celular, entretanto os estudos não mostram resultados semelhantes. Em culturas celulares, o número de células é reduzido sobre as superfícies de titânio puro (Ti) quando comparado com as culturas sobre o plástico, que exibiram números equivalentes às superfícies de liga de titânio (TiA). A diferenciação, a síntese de proteínas e a produção de fatores locais foram afetadas pela composição do material, sendo superiores nas culturas sobre superfícies de titânio puro (LINCKS et al., 1998).

O estudo de Faria, Beloti e Rosa (2003) mostrou que a adesão celular, a morfologia celular, a proliferação, o conteúdo total de proteínas, a atividade da ALP e a formação de nódulos ósseos não foram afetadas pela composição química do titânio em cultura de células da medula óssea de ratos.

Em contrapartida, outro estudo mostrou que adesão celular e o conteúdo total de proteínas não foram afetados pela composição química do titânio. Entretanto a proliferação, a atividade da ALP e a formação de nódulos ósseos foram afetadas. Estes dados sugerem que o titânio puro otimizaria a diferenciação osteoblástica

pelas células da medula óssea de ratos, incluindo a redução da proliferação celular e o aumento da atividade da ALP e da formação de nódulos ósseos (ROSA; BELOTI, 2003b).

As diferentes rugosidades superficiais do titânio também alteram a morfologia e a espessura celular em culturas de fibroblastos humanos, entretanto não afetam o volume celular. Isto sugere que as células sofrem alterações para se acomodar nas diferentes superfícies, mas seus volumes permanecem inalterados (WIELAND et al., 2002).

Por outro lado, a morfologia da adesão dos osteoblastos não foi afetada pelo recobrimento de óxido de titânio produzido pelo jateamento com plasma, enquanto que a proliferação celular foi superior com o aumento da rugosidade e da porosidade produzida por este tratamento (KIM; JANG; LEE, 2004).

Em culturas de células MG63 sobre diferentes superfícies de titânio, o número de células, a diferenciação (atividade da fosfatase alcalina e osteocalcina) e os níveis de fatores locais ($\text{TGF-}\beta 1$ e PGE_2) variaram de acordo com a microarquitetura. Cavidades de 100 μm favorecem a ocupação de osteoblastos, os quais apresentam uma morfologia mais alongada e tridimensional, típica de osteoblastos diferenciados. Nas cavidades com 10 μm , os osteoblastos ancoraram nos espaços intercavidades e se estenderam sobre as cavidades com uma morfologia mais plana e espalhada. Portanto, as rugosidades submicrométricas também são importantes para a interação das células com a superfície e para a posterior diferenciação destas células (ZINGER et al., 2005).

Alguns estudos, entretanto, não mostraram qualquer influência da topografia ou da composição das superfícies de titânio na resposta celular. Para Bigerelle e Anselme (2005) a composição dos implantes (titânio puro, liga de titânio ou aço

inoxidável) ou a rugosidade superficial (0,7 ou 2,4 μm) não são fatores importantes para a proliferação celular, a qual sofre apenas uma influência significativa do processo utilizado para produzir a morfologia superficial. Também Cai, Bossert e Jandt (2006) não mostraram uma influência significativa da rugosidade superficial em escala nanométrica na proliferação dos osteoblastos e na viabilidade celular. Além disso, Anselme e Bigerelle (2006) demonstraram que nem a composição do material (titânio puro, liga de titânio e aço inoxidável) ou rugosidade superficial (0,85 e 2,35 μm) influenciam a adesão de osteoblastos humanos.

Diante da contradição entre alguns estudos, a busca por uma superfície de titânio que favoreça a proliferação e diferenciação de osteoblastos, eventos estes que poderiam resultar em uma osseointegração mais rápida e eficiente, levou alguns pesquisadores a desenvolverem novos tipos de tratamentos superficiais.

Bigerelle et al. (2002) analisaram os efeitos da eletroerosão em substratos de titânio puro e de Ti-6Al-4V na resposta dos osteoblastos humanos. A camada celular não mostrava uma organização específica nas superfícies com eletroerosão. Quanto à proliferação celular, as superfícies tratadas com eletroerosão mostraram-se mais favoráveis à proliferação dos osteoblastos do que as superfícies polidas e desgastadas mecanicamente. A adesão de células, matriz e substrato (CMS) foi maior nas superfícies tratadas com eletroerosão em função do tempo. Os autores concluíram que a eletroerosão é um método promissor de preparo das superfícies dos implantes ósseos, favorecendo a adesão e proliferação celular.

Outro tratamento superficial do titânio consiste em um método de jateamento com partículas bifásicas de fosfato de cálcio, gerando uma superfície com rugosidade de $1,57 \pm 0,05 \mu\text{m}$, não-citotóxica aos osteoblastos de ratos (MC3T3-

E1), os quais expressam atividade da ALP e conservam sua resposta à ação da rhBMP-2 (CITEAU et al., 2005).

A resposta dos osteoblastos a superfícies químicas indica que as superfícies hidrofílicas são osteogênicas, mas a superfície de óxido de titânio exibe baixa energia superficial por causa da absorção de hidrocarbonos e carbonatos da atmosfera ou a rugosidade induz a uma hidrofobia. Diante destes fatos, Zhao et al. (2005) utilizaram um modelo de superfície de titânio hidroxilada/hidratada para manter a alta energia superficial do óxido de titânio. Os osteoblastos (MG63) cultivados sobre esta superfície exibiram um fenótipo mais diferenciado, caracterizado pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina e da osteocalcina, além de gerar um microambiente osteogênico através da alta produção de PGE₂ e TGF-β1.

Os efeitos *in vitro* de uma nova superfície de titânio com ultra-alta rugosidade e denso recobrimento (PG60, Ra=74 μm) foram analisados em comparação com superfícies de titânio com rugosidade média (TI01, Ra=18 μm) e alta (TI60, Ra=40 μm) e recobrimento poroso. No estudo, todas as preparações superficiais foram obtidas através do jateamento com plasma. A proliferação das células semelhantes a osteoblastos MG63 ocorreu de forma similar em todas as superfícies. A atividade da fosfatase alcalina (ALP) mostrou valores mais baixos nas superfícies TI60 em comparação com as superfícies TI01 e PG60. Os níveis de osteocalcina na superfície TI60 foram significativamente inferiores em comparação com aquele das superfícies TI01 e PG60. A síntese de procolágeno-1 reduziu com o aumento da rugosidade. A nova superfície com ultra-alta rugosidade e denso recobrimento mostrou uma boa resposta biológica, mas permanece similar aos outros recobrimentos já utilizados nos implantes (BORSARI et al., 2005).

Os efeitos *in vitro* das rhBMPs nos vários tipos de células têm sido examinados para propiciar o entendimento do mecanismo de indução celular responsável pela formação óssea em animais. A maioria destes estudos está focada em cartilagem, células do osso e linhagens de condroblastos e osteoblastos, onde os marcadores fenotípicos e os efeitos dos outros fatores de crescimento osteotrópicos e dos hormônios são bem conhecidos (WOZNEY, 1995).

O uso apropriado de cultura de células para avaliar os efeitos de um substrato, como a rhBMP-2, no comportamento dos osteoblastos, durante o processo de osseointegração, foi considerado dentro do contexto das pesquisas existentes. As interações dos osteoblastos com diferentes substratos podem ser medidas em termos de citotoxicidade, adesão, proliferação e diferenciação (COOPER et al., 1998).

Para analisar o papel das rhBMPs na formação e regeneração óssea, a literatura mostra uma grande variedade de estudos focados em cultura de células humanas e em cultura de células de ratos.

As rhBMPs têm importantes funções na diferenciação de células ósseas, mas o papel exato na remodelação e cicatrização óssea ainda precisa ser definido. A rhBMP-2 parece participar do recrutamento quimiotático de osteoblastos humanos indiferenciados durante a remodelação e cicatrização óssea, já que estimula a migração destas células de maneira dose-dependente (LIND; ERIKSEN; BUNGER, 1996).

Em culturas osteoblásticas e de células da medula óssea humana, a rhBMP-2 estimula a produção de fosfatase alcalina (ALP), entretanto a produção de osteocalcina, um marcador de osteoblastos maduros, não é estimulada pela rhBMP-2, sugerindo que a rhBMP-2 pode estar envolvida na indução da diferenciação de

células precursoras de osteoblastos em células osteoblásticas ao invés de estimular a diferenciação de células osteoblásticas em osteoblastos maduros (KIM; ITOH; KOTAKE, 1997).

A rhBMP-2 aumenta o nível de mRNA (ácido ribonucléico mensageiro), a atividade de fosfatase alcalina, a síntese protéica de osteopontina, da sialoproteína óssea, da osteocalcina e do colágeno tipo 1 α em culturas de células da medula óssea humana (HBMS) e de células osteoblásticas humanas (HBO). O efeito da rhBMP-2 na expressão de proteína da matriz óssea é dose-dependente de 25 a 100 ng/ml (nanogramas/mililitro), sendo evidente após 1 a 7 dias de tratamento. A atividade da fosfatase alcalina foi aumentada significativamente pela rhBMP-2 na concentração de 100 ng/ml, após 3 dias de exposição, tanto nas células HBMS como nas HBO, sendo essa estimulação dose-dependente, necessitando de 50 a 100 ng/ml de rhBMP-2. O aumento nos níveis de mRNA de colágeno tipo I nas células HBMS foi efetivo com 25 ng/ml de rhBMP-2 e superiores com 100 ng/ml. O mesmo ocorreu com os níveis de proteína do colágeno tipo I. O aumento do conteúdo de sialoproteína óssea nas células HBMS e HOB foi efetivo com a exposição destas células a 25 ng/ml de rhBMP-2. A rhBMP-2 atua de maneira efetiva na proliferação, na expressão da maioria das proteínas da matriz óssea e na mineralização de pré-osteoblastos imaturos do estroma da matriz óssea e de osteoblastos humanos maduros, mostrando assim que sua atuação é fundamental na proliferação celular (LECANDA; AVIOLI; CHENG, 1997).

Os efeitos dose-dependentes da rhBMP-2 nas células do estroma medular ósseo humano (HBMS) também foram verificados por Fromigué, Marie e Lomri (1998). O tratamento com rhBMP-2 estimulou a atividade da ALP de maneira dose-dependente, sendo os efeitos detectáveis entre 50-100 ng/ml. Em culturas de longa

duração, a rhBMP-2 promove a diferenciação celular, através do aumento na atividade da ALP, nos níveis de mRNA, osteocalcina e na deposição de cálcio, entretanto não afeta a síntese de colágeno tipo 1.

Em contrapartida, outros estudos mostram que a rhBMP-2 não tem efeito na proliferação de células ósseas, apesar de estimular a atividade da ALP e a produção do cAMP (adenosina monofosfato cíclico) dependente do hormônio paratiroideano nas células ósseas, musculares e de pele humana, sugerindo que a rhBMP-2 é um potente estimulante da diferenciação de osteoblastos e formação óssea nas células humanas (KAWASAKI et al., 1998).

Os efeitos da rhBMP-2 no crescimento celular e no fenótipo osteoblástico de células pré-osteoblásticas de calvária neonatal humana (HNC) além de serem dose-dependentes, são influenciados pelo tempo de exposição. Em um curto período de cultura (1 a 4 dias), a rhBMP-2 (20-100 ng/ml) inibe a síntese de DNA e aumenta a atividade de fosfatase alcalina sem afetar a produção de osteocalcina. Em um longo período de cultura (21 dias), a rhBMP-2 (50 ng/ml) leva à completa diferenciação dos osteoblastos, que passam a sintetizar osteocalcina (HAY et al., 1999).

A rhBMP-2 tem a habilidade de induzir a expressão de vários marcadores associados com os fenótipos osteoblásticos em culturas primárias de osteoblastos da calvária fetal de ratos, o que pode ser verificado através do aumento da atividade da ALP, da produção de AMP cíclico induzida pelo hormônio da paratireóide (PTH), da biosíntese de colágeno, da formação de nódulos mineralizados de maneira dose (10-40 ng/ml) e tempo-dependente. A rhBMP-2 também foi associada ao aumento da expressão de outros genes marcadores da diferenciação de células ósseas, como da osteocalcina, da osteopontina e da sialoproteína óssea (CHAUDHARI; RON; RETHMAN, 1997; CHEN et al., 1997).

Valcourt et al. (1999) examinaram os efeitos da rhBMP-2 na expressão de fenótipos na linhagem celular de condrócitos MC615 de ratos. A rhBMP-2 aumenta a síntese de proteína e a expressão do gene do colágeno tipo II, um marcador fenotipo de cartilagem. A expressão da osteocalcina, um marcador fenotípico de osso, também foi induzida quando as células foram tratadas com rhBMP-2, assim como aumentou a expressão do mRNA do colágeno. Os dados sugerem a possibilidade de que condrócitos podem expressar propriedades osteoblásticas quando induzidos por rhBMP-2.

Um estudo de Arpornmaeklong et al. (2004) comprovou o papel da rhBMP-2 na indução osteogênica, sendo a atividade da ALP e a deposição de mineral os marcadores mais influenciados.

A rhBMP-2 também influencia os resultados da osseointegração nos diferentes tipos de topografia superficial dos implantes de titânio. A rhBMP-2 estimula a expressão fenotípica, prolonga a atividade específica de fosfatase alcalina e proporciona uma rápida produção de osteocalcina nas superfícies de titânio rugosas, quando comparadas às superfícies de titânio polidas em cultura de células progenitoras de osteoblastos de ratos (2T9), indicando que a maior área de contato da superfície rugosa poderia melhorar os efeitos de diferenciação dos osteoblastos (ONG et al., 1997).

A produção de proteínas, a atividade de fosfatase alcalina e de hexosaminidase é aumentada nas células progenitoras de osteoblastos derivadas de rato (2T9) expostas a rhBMP-2 e cultivadas sobre superfícies de titânio com diferentes topografias (ONG; BESS; BESSHO, 1999).

Também a formação dos nódulos ósseos mineralizados, quando submetidos a agentes osteotrópicos tal como a rhBMP-2, parece sofrer influência do tipo de

superfície microtopográfica. A rhBMP-2 reduz significativamente o número de células, aumenta a área nodular e aumenta o conteúdo de cálcio em diferentes superfícies de titânio (PT, SLA e TPS). Além disso, causa um aumento da atividade de fosfatase alcalina (ALP) nas superfícies rugosas (SLA e TPS). Pode-se dizer, então, que a interação entre os fatores de crescimento ou hormônios e a microtopografia dos implantes de titânio pode modular a diferenciação e a mineralização das células ósseas (BOYAN et al., 2002).

Em contrapartida, para Van den Dolder et al. (2003) a rugosidade da superfície de titânio ou a adição de rhBMP-2 não tiveram efeitos na proliferação celular, mas a rhBMP-2 estimulou a diferenciação das células osteogênicas, através do aumento na atividade da ALP e do conteúdo de cálcio, nas superfícies de titânio usinadas (lisas) de uma maneira dose-dependente. As superfícies usinadas apresentam um aumento significativo no depósito de cálcio com a utilização de altas doses de rhBMP-2 (100 a 1000 ng/ml), enquanto que as superfícies rugosas mostraram um aumento no conteúdo de cálcio somente com 1000 ng/ml de rhBMP-2.

Kim et al. (2006a) determinaram os efeitos de diferentes superfícies de titânio nas respostas biológicas de células semelhantes a osteoblastos MG63. Estas células foram cultivadas sobre superfícies de titânio lisa (S), desgastadas com partículas grandes de areia e com ataque ácido (SLA), recobertas com hidroxiapatita (HA), hidroxifluorideo (HF), nitrato de titânio (TIN) e carbono semelhante a diamante (DLC) na presença de rhBMP-2. O número de células diminuiu significativamente nas superfícies com topografia mais rugosa (SLA e HA). O número de células nas superfícies S, HF, TIN foi maior que nas superfícies SLA, HA e DLC. As células MG63 aderiram com maior afinidade para as amostras de titânio na seguinte ordem:

HF, TIN, S, DLC, SLA e HA. Por outro lado, a proliferação celular diminuiu sobre as superfícies SLA e HA, enquanto que a expressão de genes relacionados com a formação óssea foi aumentada. Os efeitos na proliferação e na diferenciação foram mais influenciados pela topografia do que pela adição de rhBMP-2. Concluindo, a adesão e a expressão de genes osteogênicos foram aumentados pela rugosidade superficial das amostras analisadas.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi analisar a influência de diferentes superfícies de titânio na adesão após 24 horas e na proliferação e diferenciação após 7, 14 e 21 dias de células semelhantes a osteoblastos de rato (osteo-1) em culturas, na presença ou não de 20ng/ml de proteína morfogenética óssea recombinante-2 (rhBMP-2).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo das amostras

Foram utilizados 120 discos de titânio manufaturados com superfícies idênticas àsquelas usadas comercialmente nos implantes dentários. Os discos de titânio foram preparados com 1 mm (milímetro) de espessura com titânio grau 2 sem liga (ASTM F67 “Titânio sem liga para aplicações de implantes cirúrgicos”) e foram fornecidos pelo Instituto Straumann AG (Waldenburg, Suíça). Os discos foram fabricados com 15 mm de diâmetro e processados pelo Instituto Straumann AG, com as seguintes topografias superficiais: 1. superfície lisa, 2. superfície desgastada com partículas de areia e condicionamento ácido (SLA) e 3. superfície desgastada com partículas de areia e condicionamento ácido sob proteção de nitrogênio e armazenadas em solução isotônica de cloreto de sódio (SLActive).

Previamente ao cultivo celular, os discos foram lavados completamente, enxaguados com água deionizada, neutralizados em 5% de solução de bicarbonato de sódio, enxaguados em água deionizada por 3 períodos de 5 minutos ultrassonicamente e esterilizados por autoclavagem (BOYAN et al., 1998; BOYAN et al., 2002; LOHMANN et al., 1999).

Os discos SLActive, que foram entregues estéreis, em invólucros selados e mergulhados em solução isotônica de cloreto de sódio pelo Instituto Straumann AG, não sofreram lavagem.

4.2 Cultura de células

Foi utilizada, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP-FOUSP), sob parecer nº 171/03 e protocolo 175/03 (Anexo A), uma linhagem celular derivada de tecido ósseo parietal de ratos recém-nascidos (linhagem celular Osteo-1), caracterizada inicialmente por Deboni, Jaeger e Araújo (1996) e Lavos-Valereto et al. (2002) e posteriormente novamente caracterizada por Togashi et al. (2007). As células foram cultivadas em meio de cultura de Eagle Modificado por Dulbecco (DME, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA), contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma). As células foram incubadas em ambiente úmido, a 37°C, e numa atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono. A monitorização do crescimento celular foi realizada a cada 24 horas. Para o experimento, as células foram cultivadas em dois meios distintos, sendo um deles o mesmo descrito anteriormente e o outro suplementado com 20 ng/ml (nanogramas/mililitro) de rhBMP-2 (Sigma), valor este adotado no estudo de Boyan et al. (2002) e também avaliado em nosso estudo (Figura 5.2). As células foram plaqueadas em uma concentração de 3×10^3 (Figura 5.1) em discos de titânio colocados em placas de cultura de 24 poços, sendo que os meios controle e experimental foram trocados a cada 2 dias.

4.3 Método da redução do MTT

A determinação da densidade das células Osteo-1 e da dose da rhBMP-2 foi inferida a partir do método descrito abaixo.

O método da redução do MTT (brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio) se baseia no teste de atividade mitocondrial das células e indica a viabilidade celular. Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em formazan insolúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e, então, sua concentração é determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 562 nm (nanômetros) (MOSMANN, 1983). Para a realização do teste foram preparados os reagentes A e B. O reagente A é composto por 0,05 g (grama) de MTT (CalBioChem, Canadá) em 10 ml (mililitros) de PBSA e o reagente B é constituído por 1 g de dodecil sulfato de sódio (SDS) (QBioGene, EUA) em 10 ml de 0,01 M (mol) de HCl (ácido clorídrico).

Os meios de cultura dos poços foram aspirados e substituídos por 100 µl (microlitros) de meio DME. Dez microlitros do reagente A (CalBioChem) foram adicionados em cada poço teste, incluindo os poços sem células, que serviram de controle negativo para a leitura no espectrofotômetro (Amersham Biosciences, Biotrak II, Inglaterra). Depois de 4 horas de incubação com o reagente A, em estufa a 37° C e protegido da luz com folha de alumínio, 100 µl do reagente B (QBioGene) foram adicionados a cada poço. Usando pipetador multicanal essa solução foi gentilmente homogeneizada. As culturas retornaram para incubação em estufa (REVCO ULTIMA, Asheville, NC, EUA) a 37° C por 12 horas, também protegidas de luz. Decorrido esse período, as culturas foram misturadas gentilmente com o auxílio

do pipetador multicanal, e levadas para leitura de sua absorbância em espectrofotômetro ELISA (Amersham Biosciences, Biotrak II, Inglaterra), em filtro de 562 nm (nanômetros).

4.3.1 Determinação da densidade celular

Para avaliar a curva de crescimento das células Osteo-1, densidades celulares diferentes foram plaqueadas em placas de 96 poços (TPP, Suíça, Europa) em meio DME contendo SFB a 10%. Os períodos de avaliação foram de 1, 3, 5, 7 e 10 dias e as densidades de plaqueamento utilizadas foram as seguintes: 5×10^2 , 1×10^3 , 2×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 e 6×10^4 células.

4.3.2 Determinação da concentração da rhBMP-2

Células Osteo-1, em uma densidade de 5×10^2 células por poço (Figura 5.1), foram cultivadas em placas de 96 poços (TPP) e foi adicionado ao meio de cultura DME contendo SFB a 10% com as seguintes concentrações de rhBMP-2: 4 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml e 100 ng/ml.

A resposta das células Osteo-1 cultivadas em meio com diferentes concentrações de rhBMP-2 (Sigma) foi avaliada nos períodos de 1, 3, 5 e 7 dias. O

meio foi trocado em intervalos de 2 dias, sendo que o meio DME sem rhBMP-2 serviu como controle.

4.4 Grupos experimentais

Foram determinados 6 grupos experimentais:

Grupo C/Liso – células osteo-1 cultivadas sobre discos lisos e com o meio controle (n=4).

Grupo C/SLA – células osteo-1 cultivadas sobre discos com superfície SLA e com o meio controle (n=4).

Grupo C/SLActive – células osteo-1 cultivadas sobre discos com superfície SLActive e com o meio controle (n=4).

Grupo rhBMP-2/Liso – células osteo-1 cultivadas sobre discos lisos e com o meio suplementado com rhBMP-2 (n=4).

Grupo rhBMP-2/SLA – células osteo-1 cultivadas sobre discos com superfície SLA e com o meio suplementado com rhBMP-2 (n=4).

Grupo rhBMP-2/SLActive – células osteo-1 cultivadas sobre discos com superfície SLActive e com o meio suplementado com rhBMP-2 (n=4).

4.5 Adesão celular

Para a análise da adesão celular as células foram cultivadas por 24 horas. O meio de cultura foi removido e os poços foram lavados três vezes com PBS (solução salina de fosfato à 37°C) para eliminar células não inseridas. As células aderidas foram então removidas enzimaticamente (1 mM (milimol) EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e 0.25% de tripsina) dos discos e contadas usando um hemocitômetro. A adesão celular foi expressa em número de células.

4.6 Análise do conteúdo total de proteínas

Aos 7, 14 e 21 dias, o conteúdo total de proteínas na cultura foi calculado de acordo com o método de Lowry modificado (LOWRY et al., 1951). O meio de cultura dos poços foi removido, os poços lavados três vezes com PBS aquecida a 37°C e preenchidos com 2 ml de água deionizada. Foram realizados 3 ciclos, nos quais as placas foram colocadas por 20 minutos a -70°C e por 15 minutos a 37°C.

Ao final destes ciclos, 1 ml da solução de cada poço foi misturado com 1 ml de solução de Lowry e deixado em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse período foi adicionado 0,5 ml da solução de reagente de Folin e Ciocalteau e novamente deixado em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos, para permitir o desenvolvimento da coloração. Em seguida, a absorbância foi medida em um espectrofotômetro (DU 800, Beckman Coulter) utilizando o comprimento de onda de 680 nm. O conteúdo de proteína total foi calculado através de uma curva padrão e expresso em µg/ml.

Os dados do conteúdo total de proteínas foram utilizados para quantificar

indiretamente o número de células sobre os discos nos diferentes períodos experimentais.

4.7 Análise do conteúdo de colágeno

O conteúdo de colágeno foi calculado em 7, 14 e 21 dias pelo método de Reddy e Enwemeka (REDDY; ENWEMEKA, 1996). Amostras das mesmas soluções usadas para o cálculo do conteúdo total de proteínas foram analisadas para a medição do conteúdo de colágeno. Alíquotas contendo 950 µl desta solução foram liofilizadas e ressuspensas em 100 µl de ácido acético 6 N. Posteriormente, as amostras foram hidrolisadas por autoclavagem a 120°C por 30 minutos. Após esse procedimento, 900 µl de cloramina T (Acros, Pittsburg, PA, USA) foram adicionados ao hidrolisado, misturado delicadamente e a oxidação foi permitida por 25 minutos em temperatura ambiente. Após essa etapa, 1 ml de reagente de Ehrlich foi adicionado a cada amostra e misturada delicadamente. A coloração foi desenvolvida pela incubação das amostras por 20 minutos a 65°C. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em 550 nm e o conteúdo de colágeno foi calculado através de uma curva padrão, normalizado pelo conteúdo total de proteínas e expresso em µg de colágeno/mg de proteína.

4.8 Análise da atividade de fosfatase alcalina

A atividade de fosfatase alcalina foi medida com 7, 14 e 21 dias através da liberação de timolftaleína do monofosfato de timolftaleína utilizando um *kit* comercial (Labtest Diagnostica AS, MG, Brasil). Amostras das mesmas soluções utilizadas para calcular o conteúdo total de proteína foram avaliadas para medir a atividade de fosfatase alcalina. Cinquenta μ l de monofosfato de timolftaleína foram misturados a 0,5 ml de tampão de dietanolamina, 0,3 mmol/ml, pH 10,1, e mantidos a 37°C por 2 minutos. Após esse período, foram adicionados 50 μ l de lisado de cada poço. As amostras foram mantidas a 37°C por 10 minutos. Em seguida foram adicionados 2 ml de solução de Na_2CO_3 (carbonato de sódio) 0,09 mmol/ml e NaOH (hidróxido de sódio) 0,25 mmol/ml para permitir o desenvolvimento da cor. Depois de 30 minutos, a absorbância foi medida a 590 nm e a atividade de fosfatase alcalina foi calculada através de uma curva padrão de timolftaleína, normalizada pelo conteúdo total de proteínas e expressa em μ mol de timolftaleína/mg de proteína.

4.9 Análise da formação de nódulos calcificados

Após 21 dias de cultura, as células foram lavadas três vezes com PBS aquecido a 37°C. As células aderidas foram fixadas em 3% de glutaraldeído em 0,1 mol de tampão de cacodilato de sódio por 2 horas em temperatura ambiente e, posteriormente, foram lavadas na mesma solução tampão. Depois da fixação, os espécimes foram desidratados em séries crescentes de álcool e processados para coloração com a solução de vermelho de alizarina (Sigma), a qual cora os nódulos mineralizados, ricos em cálcio.

A superfície dos discos foi analisada utilizando o microscópio SZ-CT Olympus (Japão) sob luz direta e 10 campos microscópicos por disco foram selecionados de forma padronizada, com objetiva de 40X. Foram obtidas micrografias de 10 áreas de cada disco, assim localizadas: dois campos centrais e oito campos periféricos (Figura 4.1), com o objetivo de abranger as mesmas áreas de todos os discos. As imagens obtidas pelo programa Studio Version 9 – Pinnacle Studio 9 foram processadas e analisadas utilizando o software Image Tool (University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, EUA). A quantidade de formação de nódulos calcificados foi calculada através da porcentagem de área mineralizada a partir do valor médio das áreas analisadas de cada disco.

A formação de nódulos calcificados não pode ser normalizada pela quantidade total de proteínas em virtude de ter sido analisada em placas diferentes daquelas utilizadas para determinação do conteúdo total de proteínas.

Figura 4.1- Esquema dos 10 campos selecionados por disco para avaliação da formação de nódulos calcificados

4.10 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA), complementados pelo teste de Tukey. Quando as variâncias não eram iguais, os resultados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Densidade celular

A concentração que apresentou o padrão mais homogêneo de distribuição foi a de 5×10^2 , de acordo com a Figura 5.1. Para realizar o MTT são utilizadas placas de 96 poços e para a cultura placas de 24 poços, como a área dos poços da placa de 24 é aproximadamente 6 vezes a área dos poços da placa de 96, multiplicamos o resultado por 6 e chegamos ao valor ideal de plaqueamento de 3×10^3 .

Figura 5.1- Curva de crescimento das células Osteo-1 em diferentes densidades de plaqueamento, avaliada pelo método de redução do MTT expresso em unidades de MTT/densidade ótica (UMTT/DO), nos períodos de 1, 3, 5, 7 e 10 dias. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em quadruplicata

5.2 Concentração de rhBMP-2

Aos 5 e 7 dias, todas as concentrações de rhBMP-2 testadas levaram a uma redução estatisticamente significativa na atividade mitocondrial das células osteo-1 ($p=0,0000$). Os resultados podem ser observados na Figura 5.2.

Figura 5.2- Efeito dose-resposta da rhBMP-2 na viabilidade de células Osteo-1, em meio de cultura com diferentes concentrações da rhBMP-2 com troca de meio realizada a cada dois dias, avaliado nos períodos de 1, 3, 5 e 7 dias. Os dados estão expressos em unidades de MTT/densidade ótica (UMTT/DO) e apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em quadruplicata (ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, $p=0,0000$). As letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$)

Baseado nos resultados encontrados no presente estudo e no trabalho de Boyan et al. (2002), adotou-se a concentração de 20 ng/ml neste experimento.

5.3 Adesão celular

A adesão celular não foi afetada nem pelo tipo de superfície de titânio nem pelo tratamento com rhBMP-2 ($p=0,0936$). Os dados estão apresentados na Figura 5.3.

Figura 5.3- Efeito das diferentes superfícies de titânio na presença ou não de rhBMP-2 na contagem de células Osteo-1 em 24 horas. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão do experimento realizado em quadruplicata (ANOVA, $p=0,0936$)

5.4 Conteúdo total de proteína

Os maiores valores de conteúdo total de proteína, no período de 21 dias, foram observados para os grupos C/liso, C/SLA, C/SLActive, rhBMP-2/SLActive. Nos períodos de 7 e 14 dias, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Os resultados mostraram que o grupo C/SLA apresentou aumento do conteúdo total de proteína de forma tempo-dependente entre os períodos de 7 e 21 dias e entre 14 e 21 dias. O grupo SLAactive/rhBMP-2 apresentou um aumento tempo-dependente entre os períodos de 7 e 21 dias.

O tipo de superfície não influenciou o conteúdo total de proteínas em quaisquer dos períodos analisados.

A adição de rhBMP-2 levou a uma redução estatisticamente significativa na superfície SLA aos 21 dias (C/SLA > rhBMP-2/SLA). Os dados do conteúdo total de proteínas podem ser visualizados na Figura 5.4.

Figura 5.4- Conteúdo total de proteínas produzido pelas células Osteo-1 avaliado aos 7, 14 e 21 dias. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão do experimento realizado em quadruplicata (ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, $p=0,0000$) e expressos em μg proteína/ml. As letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$)

5.5 Conteúdo de colágeno

Os maiores valores do conteúdo de colágeno foram encontrados nos grupos rhBMP-2/Liso, rhBMP-2/SLA e rhBMP-2/SLActive aos 7 dias e no grupo C/Liso aos 14 dias. O grupo rhBMP-2/SLActive apresentou uma redução tempo-dependente entre os períodos de 7 e 14 dias e entre os períodos de 7 e 21 dias. Os demais grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre todos os períodos analisados.

O tipo de superfície de titânio não influenciou o conteúdo de colágeno em nenhum dos períodos analisados.

A adição de rhBMP-2 levou a um aumento estatisticamente significativo no conteúdo de colágeno na superfície SLActive no período de 7 dias ($C/SLActive < rhBMP-2/SLActive$), cujos dados podem ser visualizados na Figura 5.5.

Figura 5.5- Conteúdo de colágeno produzido pelas células Osteo-1 avaliado aos 7, 14 e 21 dias. Os dados estão normalizados pelo conteúdo total de proteínas e apresentados como média $\pm$ erro padrão do experimento realizado em triplicata (ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, $p=0,0005$) e expressos em μg colágeno/mg proteína. As letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$)

5.6 Atividade de fosfatase alcalina

Os grupos C/Liso, C/SLA, C/SLActive mostraram os maiores níveis de atividade de fosfatase alcalina no período de 21 dias, sendo que o grupo C/Liso já o apresentava aos 14 dias. O grupo C/SLActive foi o único que apresentou um aumento tempo-dependente na atividade de fosfatase alcalina em todos os períodos analisados. Os grupos C/Liso e C/SLA mostraram um aumento tempo-dependente entre os períodos de 7 e 14 dias e entre 7 e 21 dias. Os grupos rhBMP-2/SLA e rhBMP-2/SLActive apresentaram um aumento tempo-dependente entre os períodos de 7 e 21 dias. O grupo rhBMP-2/Liso foi o único que não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre todos os períodos analisados.

O tipo de superfície influenciou a atividade de fosfatase alcalina somente aos 14 dias, onde o grupo C/SLActive apresentou valores inferiores ao grupo C/Liso.

A adição de rhBMP-2 levou a uma diminuição estatisticamente significativa na atividade de fosfatase alcalina na superfície lisa nos períodos de 14 e 21 dias (C/Liso > rhBMP-2/Liso), na superfície SLA aos 14 dias (C/SLA > rhBMP-2/SLA) e na superfície SLActive aos 21 dias (C/SLActive > rhBMP-2/SLActive). Os dados da atividade de fosfatase alcalina estão apresentados na Figura 5.6.

Figura 5.6- Atividade de fosfatase alcalina das células Osteo-1 avaliada aos 7, 14 e 21 dias. Os dados estão normalizados pelo conteúdo total de proteínas e apresentados como média $\pm$ erro padrão do experimento realizado em quadruplicata (ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, $p=0,0000$) e expressos em $\mu\text{mol timolf/mg proteína}$. As letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$)

5.7 Formação de nódulos calcificados

Aos 21 dias, o grupo rhBMP-2/SLA mostrou resultados significativamente inferiores ao C/Liso. Diferenças estatisticamente significantes não foram observadas entre quaisquer dos outros grupos analisados. Estes resultados podem ser visualizados na Figura 5.7.

Figura 5.7- Formação de nódulos calcificados pelas células Osteo-1 avaliada aos 21 dias. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão do experimento realizado em quadruplicata (Teste de Kruskal-Wallis, $p=0,0456$) e expressos em porcentagem de área mineralizada. As letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$)

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi analisar a influência de diferentes superfícies de titânio na adesão, proliferação e diferenciação de células semelhantes a osteoblastos de rato (osteoblasto-1) em culturas, na presença ou não da proteína morfogenética óssea recombinante-2 (rhBMP-2).

Verificamos que a adesão não foi influenciada nem pelo tipo de superfície nem pelo tratamento com rhBMP-2. Uma vez que relacionamos o conteúdo total de proteínas ao número total de células, percebemos que a proliferação não foi influenciada pelo tipo de superfície de titânio, porém a adição de rhBMP-2 levou a uma redução estatisticamente significativa na superfície SLA aos 21 dias. Em relação à diferenciação, pudemos observar que o tipo de superfície não influenciou o conteúdo total de proteínas, o conteúdo de colágeno e a formação de nódulos calcificados em quaisquer dos períodos analisados e a atividade de fosfatase alcalina somente foi influenciada pelo tipo de superfície aos 14 dias, onde o grupo C/SLAactive apresentou valores inferiores ao grupo C/Liso. A adição de rhBMP-2 promoveu uma maior influência sobre o processo de diferenciação, levando a uma redução estatisticamente significativa no conteúdo total de proteínas na superfície SLA aos 21 dias, a um aumento estatisticamente significativo no conteúdo de colágeno na superfície SLActive no período de 7 dias e a uma diminuição estatisticamente significativa na atividade de fosfatase alcalina na superfície lisa nos períodos de 14 e 21 dias, na superfície SLA aos 14 dias e na superfície SLActive aos 21 dias. Somente a formação de nódulos calcificados não sofreu influência da adição de rhBMP-2.

Os resultados deste trabalho mostraram que a adesão não foi afetada de maneira estatisticamente significativa pelo tipo de superfície, resultado este de acordo com os trabalhos de Mustafa et al. (2001), Bigerelle et al. (2002), Ku et al. (2002), Rosa e Beloti (2003a), Van den Dolder et al. (2003), Xavier et al. (2003), e Anselme e Bigerelle (2006), que também mostraram que a rugosidade superficial não afeta a adesão de células osteoblásticas. Também Rosa e Beloti (2003b) e Masaki et al. (2005) confirmaram a hipótese de que nem a rugosidade nem o tratamento químico superficial afetam a adesão celular.

A adesão é tempo-dependente, e talvez por isso, em 24 horas, a adesão ainda não tenha mostrado diferenças entre as superfícies (AHMAD et al., 1999; XAVIER et al., 2003). Ou seja, se tivéssemos avaliado a adesão celular em períodos mais longos talvez pudéssemos encontrar diferenças entre as superfícies como observaram Sisk et al. (2001); Ku et al. (2002); Boyan et al. (2002) e Van den Dolder et al. (2003). Outra hipótese mostra que apesar de parecer que a rugosidade aumentaria a área para favorecer a adesão celular, somente a área projetada seria percebida pelas células - efeito balístico (ANSELME; BIGERELLE, 2006). Além disso, a adesão inicial não necessariamente influencia no comportamento celular posterior, o que ilustra a importância do estudo do comportamento celular *in vitro*, não apenas após algumas horas, mas em análises de períodos mais longos (ANSELME; BIGERELLE, 2006).

O número de células não justifica as diferenças na expressão genética dos osteoblastos (MASAKI et al., 2005). As contradições entre os estudos estão relacionadas a diferentes linhagens celulares e aos diferentes métodos de contagem celular (BIGERELLE; ANSELME, 2005).

Outro fator que parece influenciar a adesão é o espalhamento celular, sendo que em superfícies TPS o espalhamento celular é menor do que em superfícies SLA, mas à medida que o nível de adesão começa a ficar maior, as células passam a apresentar morfologia mais alongada, chegando a um número similar de células (ZHU et al., 2004; GALLI et al., 2005). É válido acrescentar que a topografia da superfície poderia alterar o formato celular, além de modular o nível de transcrição de fibronectina (ZHU et al., 2004).

Por outro lado, grande número de trabalhos mostra que um aumento na rugosidade superficial leva a uma diminuição na adesão celular (BACLE; KOHAL, 2004; BANNISTER et al., 2002; BATZER et al., 1998; BOYAN et al., 1995; 1998; 2002; BRETT et al., 2004; GROESSNER-SCHEREIBER; TUAN, 1992; KIESWETTER et al., 1996; KIM et al., 2005; KIM et al., 2006a; LOHMANN et al., 1999; MARTIN et al., 1995; SCHWARTZ et al., 1999; SISK et al., 2001; ZHAO et al., 2005). Não está claro ainda como o aumento da rugosidade poderia diminuir a proliferação. Alguns autores sugerem que as células que se aderem a esta superfície estão em um estágio mais avançado de desenvolvimento e diferenciação em relação às células crescendo sobre superfícies lisas, por isso mostram uma diminuição na proliferação (KIESWETTER et al., 1996; BATZER et al., 1998; SCHWARTZ et al., 1999).

Para Martin et al. (1995) existe uma dificuldade na avaliação da proliferação sobre superfícies rugosas de titânio. As células podem migrar para o interior das depressões do disco e desta forma serem mais resistentes à tripsinização, assim como o forte aprisionamento de células nas cavidades dos implantes rugosos talvez possa inibir a replicação celular e possivelmente a adesão. Outra hipótese sugere que os efeitos da rugosidade sobre a proliferação envolvem um mecanismo

dependente da PKA (proteína quinase A), já que a inibição da PKA causa um aumento na proliferação nas superfícies mais rugosas. Além disso, os efeitos da rugosidade sobre a resposta antiproliferativa ao $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (metabólito da vitamina D) também são mediados via PKA, já que a inibição desta enzima restaurou os níveis de proliferação em comparação ao grupo sem o metabólito da vitamina D (LOHMANN et al., 1999).

Vários autores acreditam que a morfologia das células varia com o aumento da rugosidade, sugerindo que as mudanças na natureza das adesões focais usadas para ancorar as células no substrato tem uma importante função. As células sobre superfícies rugosas projetam muitos processos citoplasmáticos e mudam sua forma espalhada para uma forma mais cubóide, enquanto que sobre superfícies lisas, as células permanecem alongadas e com menos processos citoplasmáticos (BOYAN et al., 1995; 1998; KIM et al., 2005; ZHAO et al., 2005; ZHAO et al., 2007). A rugosidade também modula a habilidade das células de sintetizar e secretar mediadores autócrinos e parácrinos como o $\text{TGF}\beta$ latente e a PGE_2 , indicando que a rugosidade tem um efeito direto sobre a atividade celular e um efeito indireto mediado através da produção de fatores locais (BOYAN et al., 1998).

A falta de consenso na literatura sobre o efeito da rugosidade no comportamento dos osteoblastos *in vitro* leva a outro grupo de trabalhos, onde os autores observaram que a adesão celular aumentou com o incremento da rugosidade (DEGASNE et al., 1999; ARAÚJO et al., 2001; BRETT et al., 2004; ANSELME; BIGERELLE, 2006). Os diferentes resultados quanto à adesão podem ser decorrentes das técnicas de modificação de superfície, do tipo de células utilizado e da presença ou ausência de confluência celular.

A adsorção de proteínas na superfície antes da deposição celular poderia mediar a adesão das células ao substrato. A albumina é pré-adsorvida preferencialmente nas superfícies lisas e tem um efeito inibitório na adesão celular. A rugosidade do titânio cria uma superfície mais hidrofílica, resultando em diminuição da adsorção de albumina. Entretanto, as superfícies rugosas adsorvem muito mais fibronectina, a qual poderia ser responsável pelo aumento da adesão celular nas superfícies rugosas. Como a concentração de albumina no meio de cultura é muito maior do que de fibronectina, sua pré-adsorção inibiria a adesão celular (DELIGIANI et al., 2001).

Vários estudos demonstraram a importância das propriedades físicas e da microestrutura da superfície sobre a adesão e crescimento dos osteoblastos (NOTH et al., 1999; MUSTAFA et al., 2001). Variáveis como topografia superficial, rugosidade, porosidade e capacidade de adsorção de proteínas parecem condicionar muitos aspectos da vida celular como adesão, proliferação, metabolismo, liberação de fatores de crescimento e de citocinas, crescimento e diferenciação (COOPER et al., 1999). Muitos obstáculos tornam difícil atribuir um efeito a uma única destas variáveis (ANSELME et al., 2000). Além disso, os efeitos da rugosidade da superfície sobre as células podem ser resultado da própria rugosidade ou da reação que ocorre quando a superfície do material é condicionada por um meio. Esta interação inicial produz uma camada de macromoléculas que modifica o comportamento das células. Além disso, diferenças na camada superficial de óxido podem alterar as características superficiais do material e afetar o comportamento das células. O comportamento dos osteoblastos crescendo sobre superfícies de titânio desgastadas com partículas de areia e submetidas ao ataque ácido – SLA – é único. Apesar de esta superfície ser rugosa, apresenta uma

geometria muito regular, resultando em um número de células osteoblásticas muito similar aos vistos sobre superfícies lisas (BACLE; KOHAL, 2004). Além disso, sobre superfície SLA as células não aparecem tão bem espalhadas, sendo que esta interação mais pobre com a superfície poderia explicar o número relativo baixo de células nestas superfícies (BRETT et al., 2004).

Zhao et al. (2005, 2007) mostraram que o número de células aderidas é menor nas superfícies SLActive, do que nas superfícies de SLA e nesta, por sua vez, é menor do que nas superfícies usinadas. A presença de uma complicada topografia tridimensional e de uma alta energia superficial poderiam explicar o menor número de células nas superfícies SLA.

O fato de os resultados encontrados mostrarem que a adesão não foi influenciada pelo tratamento com rhBMP-2 está de acordo com os achados de Chaudhari, Ron e Rethman (1997) e de Van den Dolder et al. (2003). Além disso, para Fromigué, Marie e Lomri (1998) apenas altas doses de rhBMP-2 poderiam diminuir o crescimento de células osteoblásticas. Logo, a rhBMP-2 pode não ser um importante modulador do mecanismo de adesão destas células.

Alguns estudos sugerem que os efeitos da rhBMP-2 sobre a proliferação de osteoblastos dependem do grau de diferenciação celular, sendo que essa proteína estimularia a proliferação em células menos diferenciadas e inibiria a proliferação em células mais diferenciadas (YAMAGUSHI et al., 1991; BERNIER; GOLTZMAN, 1992). O estudo de Lecanda, Avioli e Cheng (1997) não suportou esta hipótese, já que a rhBMP-2 inibiu a proliferação tanto em células imaturas como em células osteoblásticas humanas mais maduras, sugerindo que talvez seja mais importante o tipo celular do que o estágio de maturação.

Por outro lado, alguns estudos mostram uma redução no número de células se aderindo na presença de rhBMP-2 (HAY et al., 1999; BOYAN et al., 2002), sugerindo que a estimulação osteogênica pela rhBMP-2 não está relacionada com aumento no crescimento celular, mas com aumentos na atividade de ALP, uma vez que o efeito primário da rhBMP-2 seria promover a diferenciação de células imaturas em osteoblastos ao invés de aumentar o crescimento de células osteoblásticas indiferenciadas.

O presente trabalho verificou que o conteúdo total de proteínas não foi afetado pelo tipo de superfície de titânio, dado este de acordo com os estudos de Rosa e Beloti (2003a, 2003b), os quais mostraram que a rugosidade não teve influência sobre este parâmetro e com os estudos de Faria, Beloti e Rosa (2003) e Rosa e Beloti (2003b) que relataram que o conteúdo total de proteínas não foi afetado pela composição química do titânio em culturas de células osteoblásticas. Estes estudos mostraram que a capacidade de secreção das células não é influenciada pela topografia ou pelo tratamento químico da superfície.

Montanaro et al. (2002) também determinaram que a síntese de proteínas não foi afetada pela rugosidade, bem como Kim et al. (2006b), os quais demonstraram que a anodização do titânio, processo que provoca um aumento da rugosidade, não gerou um aumento no conteúdo total de proteínas.

Diferentes resultados quanto ao conteúdo total de proteínas podem ser decorrentes do uso de células de diferentes origens e do uso de diferentes métodos (ROSA; BELOTI, 2003a).

Porém, o estudo de Martin et al. (1995) mostrou que a rugosidade do titânio aumentou a síntese de proteínas colágenas, no entanto, não influenciou a produção de proteínas não colágenas. Para Xavier et al. (2003), o preparo de superfícies de

titânio através de desgaste ou ataque ácido leva a uma diminuição do conteúdo total de proteínas, possivelmente pela liberação de elementos constituintes do titânio, os quais podem afetar as atividades secretórias das células.

O tratamento com rhBMP-2, entretanto, levou a uma redução estatisticamente significativa no conteúdo total de proteínas no grupo SLA, aos 21 dias, contradizendo o estudo de Ong, Bess e Besho (1999), o qual mostrou que o conteúdo total de proteínas é aumentado em culturas de células osteoblásticas expostas a rhBMP-2 sobre superfícies de titânio rugosas. No entanto, as avaliações neste estudo foram realizadas 4 dias após a confluência celular. O estudo de Hay et al., 1999, comprova nossos resultados mostrando o efeito negativo da rhBMP-2 sobre a proliferação celular em longos períodos de cultura.

Nesta pesquisa, o tipo de superfície de titânio não afetou o conteúdo de colágeno, contrariando a literatura que mostra que a rugosidade superficial aumenta o mesmo (GROESSNER-SCHREIBER; TUAN, 1992; MARTIN et al., 1995; LINCKS et al., 1998; MASAKI et al., 2005). Para Lincks et al. (1998), o aumento da síntese de colágeno nas superfícies mais rugosas mostra uma correlação positiva com os aumentos na produção de PGE_2 e de TGF- β latente com o aumento da rugosidade superficial. Tanto a PGE_2 como o TGF- β latente são produzidos pelos osteoblastos como reguladores autócrinos e parácrinos da função e diferenciação celular. A liberação destes fatores é aumentada nas células crescendo sobre superfícies rugosas, suportando a hipótese de que sobre estas superfícies as células mostram um fenótipo osteoblástico mais diferenciado. Entretanto, não se sabe se as células mais diferenciadas produzem uma maior quantidade destes fatores locais ou se as células são mais diferenciadas em resposta a esta alta produção destes fatores.

Os efeitos da rhBMP-2 sobre a síntese de colágeno são variáveis em diferentes sistemas celulares. Para Fromigué, Marie e Lomri (1998) e Kessler et al. (2000), a BMP-2 não afetou a síntese de colágeno em células osteoblásticas humanas, mesmo em altas concentrações ou em tratamentos em longo prazo.

Entretanto, nosso trabalho mostrou que a rhBMP-2 promoveu um aumento estatisticamente significativo da síntese de colágeno na superfície SLActive aos 7 dias, o qual também pode ser notado nas outras superfícies neste período, porém sem diferença estatisticamente significativa. Outros estudos também mostraram que a rhBMP-2 estimula a diferenciação de uma grande variedade de células osteoblásticas, através de aumentos na síntese de colágeno (TAKUWA et al., 1991; CHEN et al., 1997; VALCOURT et al., 1999). O estudo de Chen et al. (1997) apresentou os maiores valores na síntese de colágeno estimulada pela rhBMP-2 entre o quinto e o sétimo dia, da mesma maneira que ocorreu em nosso trabalho.

Uma vez que iniciamos a discussão sobre o processo de diferenciação de células osteoblásticas, seria interessante ressaltar os acontecimentos envolvidos durante este mecanismo. Inicialmente, as células osteoblásticas passam por um processo de proliferação, sendo que o aumento evidente do número de células acontece durante a primeira semana. Neste momento, temos um pico na produção de colágeno, a qual representa a síntese de matriz extracelular. Chega o momento de iniciar o processo de diferenciação, portanto as células diminuem o processo de proliferação e de produção de colágeno e passam a sintetizar uma grande quantidade de fosfatase alcalina. Para dar continuidade ao processo de diferenciação, é necessário aumentar a síntese de proteínas ligantes de cálcio (osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea), desta forma, há uma diminuição da atividade de ALP por volta do final da primeira semana e aumento progressivo da

síntese de osteocalcina e do processo de mineralização até o final da terceira semana (HAY et al., 1999). Os trabalhos de Puleo (1997), de Cooper et al. (1998) e de Fromigué, Marie e Lomri (1998), confirmam o desenvolvimento deste mecanismo.

Células semelhantes a osteoblastos cultivadas sobre discos de titânio com superfície SLA comportam-se de maneira semelhante às células cultivadas sobre outras superfícies rugosas, mostrando um aumento na atividade da ALP (LOHMANN et al., 1999; BOYAN et al., 2001; SCHWARTZ et al., 2001; BOYAN et al., 2002). Entretanto, para Sisk et al. (2001) e para Galli et al. (2005), apesar dos osteoblastos mostrarem um aumento na atividade da ALP, esses efeitos são mais evidentes nas superfícies jateadas por plasma de titânio (TPS) do que nas superfícies SLA.

A literatura mostra que a rugosidade superficial do titânio estimula a diferenciação celular, sendo que muitos autores mostram um aumento na atividade da ALP, um marcador precoce de diferenciação osteogênica, em superfícies de titânio rugosas (BÄCKLÉ; KOHAL, 2004; BANNISTER et al., 2002; BATZER et al., 1998; BOYAN et al., 1998; 2001; 2003; GROESSNER-SCHREIBER; TUAN, 1992; KIESWETTER et al., 1996; KIM et al., 2006b; LINCKS et al., 1998; LOHMANN et al., 1999; MONTANARO et al., 2002; PERIZZOLO, LACEFIELD, BRUNETTE, 2001; SCHWARTZ et al., 1999; SISK et al., 2001).

O aumento na expressão de marcadores de maturação fenotípica, como a atividade de ALP, envolve um aumento da produção de fatores locais autócrinos e parácrinos, como o TGF β 1 e as PGE $_2$, os quais mediam os efeitos da superfície sobre as células (BATZER et al., 1998; SCHWARTZ et al., 1999; BOYAN et al., 1998; 2001; 2003; SISK et al., 2001; BANNISTER et al., 2002; MONTANARO et al., 2002). O aumento na atividade da ALP dependente da rugosidade superficial também poderia ser mediado através de um mecanismo dependente da fosfolipase

A₂, a qual não está envolvida no subsequente metabolismo do ácido aracdônico em prostaglandina ou através de receptores de integrina, as quais mediam seus efeitos através da PKC e da PKA (LOHMANN et al., 1999; BOYAN et al., 2001; SISK et al., 2001; MONTANARO et al., 2002). Os altos níveis de produção de PGE₂ pelas células cultivadas sobre superfícies rugosas também envolvem elevados níveis de COX-1 e COX-2, as quais também participariam das respostas celulares fisiológicas à rugosidade superficial (BANNISTER et al., 2002).

Martin et al. (1995) mostraram uma diminuição na atividade da ALP em nível celular em superfícies CA/SLA, porém, observaram aumento da atividade de ALP avaliada na camada celular. Também Citeau et al. (2005) e Borsari et al. (2005) mostraram uma diminuição na atividade da ALP em superfícies desgastadas com partículas de fosfato de cálcio, com rugosidade alta ou ultra-alta.

Outros autores, porém, mostram que nenhuma diferença estatisticamente significativa pode ser observada na expressão da atividade da ALP com o aumento da rugosidade superficial (DELIGIANNI et al., 2001; MUSTAFA et al., 2001; ROSA; BELOTI, 2003b; XAVIER et al., 2003) ou com a alteração química da superfície do titânio (FARIA; BELOTI; ROSA, 2003). Em contrapartida, Rosa e Beloti (2003b) mostraram que a atividade da ALP pode ser afetada pela composição química do titânio, sugerindo que o titânio puro otimizaria a diferenciação osteoblástica de células da medula óssea de ratos, enquanto que o estudo de Rosa e Beloti (2003a) mostrou que a atividade de ALP seria influenciada pela rugosidade.

A grande divergência existente na literatura, ainda pode ser explicada pela diferença entre os tipos de células utilizadas, bem como seu estágio de diferenciação e pelos períodos em que são realizadas as avaliações. Além disso,

alguns autores esperam a confluência celular para somente depois contar o período que deverá ser feita a análise ou a realiza imediatamente após este momento.

O presente estudo não mostrou diferenças na atividade de ALP entre as superfícies aos 7 dias, talvez pelo fato da rugosidade exercer seus efeitos apenas nos estágios iniciais, já que a estratificação celular e a deposição de matriz poderiam reduzir a exposição das células à rugosidade (MONTANARO et al., 2002).

No entanto, mostrou uma redução estatisticamente significativa na atividade de ALP na superfície SLActive quando comparada à superfície lisa aos 14 dias, dado este de acordo com o estudo de Ku et al. (2002), que mostrou uma atividade de ALP na superfície lisa superior à superfície rugosa em 2 semanas e na terceira semana sem diferença entre as mesmas. Este estudo também normalizou a atividade de ALP pelo conteúdo total de proteínas e sugere como possível explicação para o ocorrido, que a liberação de íons durante a preparação da superfície poderia prejudicar a síntese de ALP.

Apesar de a diferença estatística ter sido notada apenas aos 14 dias, durante os outros períodos sempre houve uma tendência de uma atividade de ALP inferior nas superfícies SLA e SLActive quando comparadas à lisa. Isto talvez se deva a uma seleção de células mais diferenciadas por estas superfícies, portanto elas iniciam o processo de diferenciação de forma mais precoce, com atividade de ALP elevada entre os períodos de 7 e 14 dias, e passam a expressar outros marcadores de estágios mais avançados da diferenciação (osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea) nesse período, com conseqüente diminuição da ALP. Mesmo não avaliando estes fatores, aos 21 dias os resultados mostraram áreas de nódulos calcificados semelhantes entre todas as superfícies, apesar da tendência de diminuição da ALP nas superfícies rugosas. Os trabalhos de Ong et al. (1997) e de

Ku et al. (2002) mostraram a manifestação precoce de osteocalcina nas superfícies rugosas, confirmando um processo de diferenciação mais precoce das células aderidas sobre este tipo de superfície.

A superfície SLActive mostra uma reduzida contaminação com hidrocarbonos e um aumento na hidrofília, mas sem alteração na topografia. Os osteoblastos cultivados sobre essa superfície limpa e hidrofílica produzem marcadores mais diferenciados, representados pelo aumento da atividade de ALP e da produção de osteocalcina, e criam um ambiente osteogênico através do aumento de fatores locais, como a PGE_2 e dos níveis de $TGF\beta 1$ latente e ativo (ZHAO et al., 2005).

Os resultados do presente trabalho mostraram uma influência mais pronunciada do tratamento com rhBMP-2 na atividade de fosfatase alcalina, representada por uma diminuição estatisticamente significativa deste parâmetro na superfície lisa nos períodos de 14 e 21 dias, na superfície SLA aos 14 dias e na superfície SLActive aos 21 dias.

Estes dados não devem ser analisados de forma isolada. É importante que os mesmos sejam interpretados com as demais avaliações feitas. Aos 7 dias, é possível perceber que houve uma diminuição do conteúdo total de proteínas com a adição de rhBMP-2, a qual reflete o número de células, mas ao mesmo tempo houve um aumento do conteúdo de colágeno, com diferença estatisticamente significativa para o grupo rhBMP-2/SLActive, quando comparado aos demais grupos tratados com o meio controle. Provavelmente, seja o momento oportuno para o início do processo de diferenciação. Chaudhari, Ron e Rethman (1997) mostraram que a concentração necessária de rhBMP-2 para produzir o máximo efeito na estimulação da atividade de ALP e da síntese de colágeno é a mesma, sugerindo que a indução da fosfatase alcalina é direta ou indiretamente ligada com a síntese ou acúmulo de matriz

colágena. O grupo rhBMP-2/Liso apresenta o mesmo valor de atividade de ALP em todos os períodos analisados, mostrando que, provavelmente, a partir do sétimo dia já esteja havendo um aumento na síntese de osteocalcina. Os grupos rhBMP-2/SLA e rhBMP-2/SLActive apresentaram um aumento tempo-dependente, somente entre os períodos de 7 e 21 dias, sugerindo que aos 14 dias, a atividade de ALP esteja chegando ao seu patamar, com conseqüente aumento de osteocalcina. Estas análises podem ser sugeridas, uma vez que não houve diferenças entre os grupos tratados com rhBMP-2 em relação aos nódulos calcificados, estágio final da diferenciação, mesmo com um aparente número inferior da síntese de proteína total (HAY et al., 1999; PULEO, 1997; COOPER et al., 1998; FROMIGUÉ; MARIE; LOWRI, 1998).

A literatura mostra que a rhBMP-2 induz à diferenciação de uma grande variedade de células mesenquimais em fenótipos osteoblásticos, cultivados sobre plástico (TAKUWA et al., 1991; THIES et al., 1992; LECANDA et al., 1997; PULEO, 1997; FROMIGUÉ; MARIE; LOMRI, 1998; KAWASAKI et al., 1998; KESSLER et al., 2000) ou sobre discos de titânio (ONG et al., 1997; ONG; BESS; BESSHO, 1999; CITEAU et al., 2005), as quais respondem a rhBMP-2 com um aumento na atividade de fosfatase alcalina. Para Boyan et al. (2002), a atividade de fosfatase alcalina também foi aumentada pela rhBMP-2 em todas as superfícies de titânio rugosas, mas os efeitos estimulatórios foram bem menores do que nas superfícies lisas. Também Van den Dolder et al. (2003) verificaram que a adição de rhBMP-2 aumentou a atividade da ALP de maneira mais significativa nas superfícies usinadas do que nas superfícies de titânio mais rugosas. Estes dois trabalhos confirmam, portanto, a atuação mais evidente da rhBMP-2 sobre a superfície lisa encontrada em nosso experimento.

Mais uma vez é válido ressaltar que a comparação entre os trabalhos deve ser feita de forma cuidadosa devido a grande divergência de metodologia entre os mesmos. Poucos são os estudos que fazem culturas com períodos de duração maiores, entre 2 e 4 semanas (ARPORNMAEKLONG et al., 2004; BOYAN et al., 2002; CHAUDHARI; RON; RETHMAN, 1997; CHEN et al., 1997; DELIGIANNI et al., 2001; FROMIGUÉ; MARIE; LOMRI, 1998; HAY et al., 1999; KIM et al., 1997; LECANDA et al., 1997; PULEO, 1997; VAN DEN DOLDER et al., 2003). Os demais geralmente fazem avaliações em períodos mais curtos ou simplesmente aguardam a confluência para realizá-las.

Os efeitos da rhBMP-2 na diferenciação de células osteoblásticas, além de serem dose-dependentes (FROMIGUÉ; MARIE; LOMRI, 1998; FIEDLER et al., 2002), são influenciados pelo tempo de exposição, já que em culturas mais longas (21 dias), a rhBMP-2 além de aumentar a atividade de fosfatase alcalina, leva à completa diferenciação dos osteoblastos, que passam a sintetizar osteocalcina (HAY et al., 1999). O estágio de diferenciação celular também pode influenciar a síntese de ALP, quando as células são estimuladas pela rhBMP-2, uma vez que Kim et al. (1997) mostraram que a rhBMP-2 estimulou a síntese de ALP em células da medula óssea e não apresentou influência sobre células osteoblásticas. Os efeitos tempo e dose-dependente da rhBMP-2 também foram verificados por Chaudhari, Ron e Rethman (1997), Chen et al. (1997) e Arpornmaeklong et al. (2004).

Nossos resultados também mostraram que a formação de nódulos calcificados não foi influenciada pelo tipo de superfície, dados estes de acordo com os trabalhos de Rosa e Beloti (2003a, 2003b). Para Faria, Beloti e Rosa (2003) a formação de nódulos calcificados não foi afetada pela composição química do titânio em cultura de células da medula óssea de ratos. Em contrapartida, outro estudo

desse mesmo grupo mostrou que a composição química do titânio afetou a formação de nódulos calcificados, sugerindo que o titânio puro otimizaria a diferenciação osteoblástica (ROSA; BELOTI, 2003b). O uso de diferentes tipos celulares impede a comparação entre estudos já que, por exemplo, células semelhantes a osteoblastos MG63 não são capazes de produzir nódulos ósseos enquanto que células da calvária fetal de ratos têm uma capacidade de formação de matriz superior às células da medula óssea de ratos (ROSA; BELOTI, 2003b).

O presente estudo verificou que a formação de nódulos calcificados não foi influenciada pelo tratamento com rhBMP-2, contrariando muitos estudos que cultivaram células osteoprogenitoras em superfície plástica. Estes mostraram que a rhBMP-2 é capaz de aumentar a mineralização (ARPORNMAEKLONG et al., 2004; BI; SIMMONS; MAINOUS, 1999; CHAUDHARI; RON; RETHMAN, 1997; CHEN et al., 1997; FROMIGUÉ; MARIE; LOMRI, 1998; HANADA; DENNIS; KAPLAN, 1997; HAY et al., 1999; LECANDA; AVIOLI; CHENG, 1997; PULEO, 1997; VALCOURT et al., 1999). Entre os trabalhos que cultivaram células osteoprogenitoras sobre superfícies de titânio, Boyan et al. (2002) observaram aumento na formação de nódulos após aplicação de rhBMP-2, nas superfícies lisa e SLA e diminuição na superfície TPS.

O aumento na mineralização parece estar relacionado com os aumentos na expressão de osteopontina, sialoproteína óssea e osteocalcina, proteínas essenciais para o processo de mineralização. A sialoproteína óssea atua como um catalisador para a formação de hidroxiapatita e estimula a diferenciação de pré-osteoblastos em osteoblastos capazes de promover calcificação. A osteopontina e a osteocalcina modulam o alongamento e crescimento da hidroxiapatita (LECANDA; AVIOLI; CHENG, 1997). O aumento da mineralização em resposta a rhBMP-2 parece ser

mais expressivo em culturas de curta duração, 7 e 14 dias, do que em culturas mais longas, como 21 dias (PULEO, 1997; HAY et al., 1999). Os efeitos estimulatórios da rhBMP-2 sobre a mineralização são independentes das mudanças no depósito de colágeno na matriz e da síntese de proteínas. O tratamento com rhBMP-2 leva a um aumento no número e no tamanho dos nódulos, sem afetar a síntese de colágeno, sendo que a menor mineralização induzida pelo tratamento contínuo com rhBMP-2 não reflete uma diminuição na síntese de matriz, mas pode ser resultado do efeito negativo da rhBMP-2 sobre o crescimento celular em longos períodos de cultura (HAY et al., 1999).

Talvez uma das grandes limitações do nosso estudo tenha sido uma única avaliação do estágio mais avançado do processo de diferenciação celular, com a análise de nódulos calcificados aos 21 dias. Seria muito interessante ter feito outra análise aos 14 dias, com a complementação dos valores de osteocalcina nestes dois períodos. Além disso, poderíamos ter realizado avaliações do conteúdo total de proteínas, do conteúdo de colágeno e da atividade de ALP em um período mais curto, por volta do quarto dia, para termos resultados de um momento mais precoce do processo de diferenciação. Desta maneira, provavelmente conseguiríamos entender melhor a atuação das diferentes superfícies de titânio e da adição de rhBMP-2 durante o processo de diferenciação celular.

A mineralização também foi substancialmente aumentada nas culturas sobre as superfícies rugosas nos estudos de Groessner-Schreiber e Tuan (1992), Batzer et al. (1998), Boyan et al. (1998), Lohmann et al. (1999) e Schneider et al. (2003). A maior formação de nódulos calcificados nestas superfícies poderia ser decorrente de alterações relacionadas com a topografia, como a produção de multicamadas, orientação das fibras de colágeno e alterações na forma celular (PERIZZOLO;

LACEFIELD; BRUNETTE, 2001). Para Schneider et al. (2003) a maior mineralização nas superfícies rugosas não ocorre devido à diminuição na proliferação celular, mas está relacionada com o aumento da expressão genética da Cbfa1 (que regula a diferenciação osteoblástica e a subsequente mineralização) e da BSPII (sialoproteína óssea), sugerindo que a interação das células com os componentes da matriz extracelular nas diferentes topografias superficiais pode influenciar a expressão genética de alguns mediadores.

O estudo de Xavier et al. (2003) mostrou que a formação de nódulos calcificados foi maior nas superfícies de titânio usinadas sem nenhum tipo de tratamento de superfície. Tanto o ataque ácido como o desgaste com partículas de areia podem levar à liberação de alumínio ou outros íons constituintes do titânio, o que poderia interferir negativamente no processo de mineralização. Além da liberação de íons, é possível que a própria topografia afete a formação de nódulos calcificados.

No estudo de Boyan et al. (2002), apenas as células osteoblásticas cultivadas sobre superfícies rugosas e tratadas com rhBMP-2 depositaram mineral semelhante a osso em íntimo contato com o colágeno. A quantidade de mineral variou de acordo com a rugosidade superficial e foi maior para células cultivadas sobre a superfície TPS, na presença de rhBMP-2, que nas culturas sobre a superfície SLA nas mesmas condições. É válido acrescentar que o mineral formado em resposta a rhBMP-2 nas superfícies TPS e SLA estava associado ao colágeno, indicando que era mais fisiológico. Essas observações sugerem que os efeitos da rhBMP-2 resultam na produção de uma matriz extracelular normal e na deposição de cristais.

O presente estudo, porém, não comprovou superioridade da superfície SLA ou da superfície SLActive em relação à superfície de titânio lisa. Parece que apesar

dos implantes com superfície SLA mostrarem um maior contato ósseo em comparação com os implantes apenas desgastados com partículas de areia, diferença essa atribuída ao condicionamento ácido com HCl e H₂SO₄, ainda não se sabe se esse ataque ácido pode alterar outras características, como as propriedades eletroquímicas da superfície dos implantes (BUSER et al., 1991).

Nosso estudo mostrou não haver diferenças em relação à formação de nódulos calcificados entre as superfícies estudadas, não obstante a produção de ALP ter sido numericamente inferior nas superfícies SLA e SLActive em relação à lisa. Sabe-se que o nível máximo de atividade de ALP mostra que a matriz está apta para iniciar o processo de mineralização, portanto talvez as superfícies SLA e SLActive conduzam a uma situação mais precoce de mineralização, uma vez que seus valores de ALP são menores, porém com a mesma quantidade de área mineralizada aos 21 dias.

Atualmente, não existem explicações claras para as discrepâncias nas observações entre os vários grupos celulares. Pode-se apenas sugerir que tipos celulares, número de células e condições de cultura são parâmetros relevantes no processo final de diferenciação celular. Além disso, o tipo de superfície pode ter uma importante função na expressão de fenótipos osteoblásticos (VAN DEN DOLDER et al., 2003).

As reações celulares a um material de implante são complexas e não podem ser totalmente entendidas através de métodos biológicos padronizados. A variedade no tamanho dos discos de titânio e de manufatura, assim como os diferentes períodos de cultura e densidades de cultivo tornam difíceis as comparações entre os estudos, o mesmo ocorrendo com os diferentes valores de rugosidade (BÄCKLÉ; KOHAL, 2004). Deve-se levar em consideração o fato de que os diferentes

resultados entre os estudos também podem ser decorrentes das diferentes técnicas de modificação de superfícies, espécie ou estágio de maturação das células, confluência da camada celular ou não, entre outras (DELIGIANNI et al., 2001).

Dentro das limitações deste trabalho, pudemos verificar que os tipos de superfície de titânio estudados e a adição de rhBMP-2 ao meio tiveram influência sobre os parâmetros analisados. Grande parte das discrepâncias apresentadas pela literatura pode ser justificada pelos seguintes fatores: o tipo celular e o seu grau de diferenciação, a forma como a cultura é conduzida, os meios de cultura, a dose de rhBMP-2 utilizada e o seu modo de aplicação, os diferentes tipos de superfície de titânio e suas técnicas de preparo, os períodos selecionados de avaliação, após ou não o término da confluência celular e os parâmetros escolhidos para verificar o comportamento das células. Percebemos que o processo de diferenciação das células osteoblásticas é extremamente complexo, muitas são as variáveis envolvidas, bem como o momento em que ocorrem, além da existência ou não da associação entre as mesmas. Enfim, a modificação das superfícies de titânio e a utilização de substâncias osteoindutoras como a rhBMP-2 podem influenciar o processo de osseointegração dos implantes, portanto novas pesquisas deverão ser realizadas para melhor entendermos esse elaborado processo de reparação.

7 CONCLUSÕES

Dentro das limitações do trabalho, concluiu-se que:

1. A adesão das células osteo-1 não foi influenciada nem pelo tipo de superfície de titânio nem pelo tratamento com rhBMP-2;
2. O conteúdo total de proteínas foi relacionado de forma indireta ao número total de células, portanto a proliferação não foi influenciada pelo tipo de superfície de titânio, porém a adição de rhBMP-2 levou a uma redução estatisticamente significativa na superfície SLA aos 21 dias;
3. O tipo de superfície não influenciou o conteúdo total de proteínas, o conteúdo de colágeno e a formação de nódulos calcificados em quaisquer dos períodos analisados. A atividade de fosfatase alcalina somente foi influenciada pelo tipo de superfície aos 14 dias, onde o grupo C/SLAactive apresentou valores inferiores ao grupo C/Liso.
4. A adição de rhBMP-2 promoveu uma maior influência sobre o processo de diferenciação, levando a uma redução estatisticamente significativa no conteúdo total de proteínas na superfície SLA aos 21 dias, a um aumento estatisticamente significativo no conteúdo de colágeno na superfície SLActive no período de 7 dias e a uma diminuição estatisticamente significativa na atividade de fosfatase alcalina na superfície lisa nos períodos de 14 e 21 dias, na superfície SLA aos 14 dias e na superfície SLActive aos 21 dias. Somente a formação de nódulos calcificados não sofreu influência da adição de rhBMP-2.

REFERÊNCIAS¹

- Ahmad M, Gawronski D, Blum J, Goldberg J, Gronowicz G. Differential response of human osteoblast-like cells to commercially pure (cp) titanium grades 1 and 4. *J Biomed Mater Res* 1999;46(1):121-31.
- Albrektsson T, Branemark PI, Hanson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 1981;52:155-70.
- Anselme K, Biggerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J Biomed Mater Res* 2000;49(2):155-66.
- Anselme K, Biggerelle M. Statistical demonstration of the relative effect of surface chemistry and roughness on human osteoblast short-term adhesion. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17:471-9.
- Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000;21(7):667-81.
- Araújo NS, Jaeger RG, Todescan FF, Jaeger MMM, Groll W. Cell culture test for assessing attachment and proliferation on titanium dental implants with modified surfaces. *Rev Pós Grad* 2001;8(2):103-9.
- Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, Kubler NR, Wurzler KK. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33(1):60-70.
- Asahina I, Watanabe M, Sakurai N, Mori M, Enomoto S. Repair of bone defect in primate mandible using a bone morphogenetic protein (BMP) – hydroxyapatite-collagen composite. *J Med Dent Sci* 1997;44(3):63-70.
- Aubin JE. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 1998;30-31:73-82.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Bächle M, Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Impl Res* 2004;15:683-92.

Bannister SR, Lohmann CH, Liu Y, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, et al. Shear force modulates osteoblast response to surface roughness. *J Biomed Mater Res* 2002;60(1):167-74.

Batzer R, Liu Y, Cochran DL, Szmuckler-Moncler S, Dean DD, Boyan BD, et al. Prostaglandins mediate the effects of titanium surface roughness on MG63 osteoblast-like cells and alter cell responsiveness to $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. *J Biomed Mater Res* 1998;41(3):489-96.

Bernier SM, Goltzman D. Effect of protein and steroidal osteotropic agents on differentiation and epidermal growth factor-mediated growth of the CFK1 osseous cell line. *J Cell Physiol* 1992;152(2):317-27.

Bigerelle M, Anselme K. Statistical correlation between cell adhesion and proliferation on biocompatible metallic materials. *J Biomed Mater Res* 2005;72A:36-46.

Bigerelle M, Anselme K, Noall B, Ruderman I, Hardouin P, Iost A. Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to increase in vitro human osteoblast response. *Biomaterials* 2002;23(7):1563-77.

Bi LX, Simmons DJ, Mainous E. Expression of BMP-2 by rat bone marrow stromal cells in culture. *Calcif Tissue Int* 1999;64(1):63-8.

Borsari V, Giavaresi G, Fini M, Torricelli P, Salito A, Chiesa R, et al. Physical characterization of different-roughness titanium surfaces, with and without hydroxyapatite coating, and their effects on human osteoblast-like cells. *J Biomater Res* 2005;75B:359-68.

Boyan BD, Batzer R, Kieswetter K, Liu Y, Cochran DL, Szmuckler-Moncler S, et al. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. *J Biomed Mater Res* 1998;39(1):77-85.

Boyan BD, Bonewald LF, Paschalis EP, Lohmann CH, Rosser J, Cochran DL, et al. Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography. *Calcif Tissue Int* 2002;71(6):519-29.

Boyan BD, Hummert TW, Kieswetter K, Schraub D, Dean DD, Schwartz Z. Effect of titanium surface characteristics on chondrocytes and osteoblasts in vitro. *Cells and Materials* 1995;5(4):323-35.

Boyan BD, Lohmann CH, Sisk M, Liu Y, Sylvia VL, Cochran DL, et al. Both cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mediate osteoblast response to titanium surface roughness. *J Biomed Mater Res* 2001;55(3):350-9.

Boyan BD, Lossdörfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann CH, Cochran DL, et al. Osteoblast generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur Cells Materials* 2003;6:22-7.

Brett PM, Harle J, Salih V, Mihoc R, Olsen I, Jones FH et al.. Roughness response genes in osteoblasts. *Bone* 2004;35(1):124-33.

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;83(7):529-33.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs *J Biomed Mater Res* 1991;25:889-902.

Cai K, Bossert J, Jandt KD. Does the nanometer scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2006;49:136-44.

Carlsson L, Röstlund T, Albrektsson B, Albrektsson T. Removal torques for polished and rough titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988;3(1):21-4.

Chaudhari A, Ron E, Rethman MP. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates differentiation in primary cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Mol Cell Biochem* 1997;167(1-2):31-9.

Chen D, Harris MA, Rossini G, Dunstan CR, Dallas SL, Feng JQ, et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 1997;60(3):283-90.

Citeau A, Guicheux J, Vinatier C, Layrolle P, Nguyen TP, Pilet P, et al. In vitro biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid blasting. *Biomaterials* 2005;26(2):157-65.

Cooper LF, Masuda T, Whitson W, Yliheikkilä P, Felton DA. Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. *Int J oral Maxillofac Implants* 1999;14(1):37-47.

Cooper LF, Masuda T, Yliheikkilä P, Felton DA. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13(2):163-74.

Deboni MCZ, Jaeger MMM, Araujo NS. Development and characterization of osteoblast-like cells line. *Rev Fac Odontol Univ São Paulo* 1996;3(3):220-9.

Degasne I, Baslé MF, Demais V, Huré G, Lesourd M, Grolleau B, et al. Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcif Tissue Int* 1999;64:499-507.

Deligianni DD, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials* 2001;22:1241-51.

Faria ACL, Beloti MM, Rosa AL. Nitric Acid Passivation Does Not Affect in Vitro Biocompatibility of Titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:820-5.

Ferguson SJ, Broggini N, Wieland M, de Wild M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, et al. Biomechanical evaluation of the interfacial strength of a chemically modified sandblasted and acid-etched titanium surface. *J Biomed Mater Res A* 2006 Aug;78(2):291-7.

Fromigué O, Marie PJ, Lomri A. Bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- β 2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* 1998;68:411-26.

Galli C, Guizzardi S, Passeri G, Martini D, Tinti A, Mauro G, et al. Comparison of human mandibular osteoblasts grown on two commercially available titanium implant surfaces. *J Periodontol* 2005;76(3):364-72.

Groessner-Schreiber B, Tuan RS. Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces in vitro. *J Cell Sci* 1992;101(Pt1):209-17.

Hanada K, Dennis JE, Caplan AI. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Bone and Mineral Res* 1997;12(10):1606-14.

Hay E, Hott M, Graulet AM, Lomri A, Marie PJ. Effects of bone morphogenetic protein-2 on human neonatal calvaria cell differentiation. *J Cell Biochem* 1999;72:81-93.

Herr G, Hartwig CH, Boll C, Kusswetter W. Ectopic bone formation by composites of BMP and metal implants in rats. *Acta Orthop Scand* 1996;67(6):606-10.

Kawai T, Miki A, Ohno Y, Umemura M, Kataoka H, Kurita S, et al. Osteoinductive of composites of bone morphogenetic protein and pure titanium. *Clin Orthop* 1993;290:296-305.

Kawasaki K, Aihara M, Honmo J, Sakurai S, Fujimaki Y, Sakamoto K, et al. Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on differentiation of cells isolated from human bone, muscle, and skin. *Bone* 1998;23(3):223-31.

Keller JC, Stanford CM, Wightman JP, Draughn RA, Zaharias R. Characterizations of titanium implant surfaces. III. *J Biomed Mater Res* 1994;28(8):939-46.

Kessler S, Kastler S, Mayr-Wohlfart U, Puhl W, Gunther KP. Stimulation of primary osteoblast cultures with rh-TGF- β , rh-bFGF, rhBMP-2 e rx-BMP-4 in an in vitro model. *Orthopade* 2000;29(2):107-11.

Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert TW, Cochran DL, Simpson J, Dean DD, et al. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *J Biomed Mater Res* 1996;32:55-63.

Kim CS, Sohn SH, Jeon SK, Kim KN, Ryu JJ, Kim MK. Effect of various implant coatings on biological responses in MG63 using cDNA microarray. *J Oral Rehabilitation* 2006a;33:368-79.

Kim KH, Kwon TY, Kim SY, Kang IK, Kim S, Yang Y, et al. Preparation and characterization of anodized titanium surfaces and their effect on osteoblast responses. *J Oral Implantol* 2006b;32(1):8-13.

Kim HK, Jang JW, Lee CH. Surface modification of implant materials and its effect on attachment and proliferation of bone cells. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:825-30.

Kim HJ, Kim SH, Kim MS, Lee EJ, Oh HG, Oh WM, et al. Varying Ti-6Al-4V surface roughness induces different early morphologic and molecular responses in MG63 osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res* 2005;74A:366-73.

Kim KJ, Itoh T, Kotake S. Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on human bone marrow cells cultured with various biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1997;35(3):279-85.

Kirker-Head CA. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;43(1):65-92.

Ku CH, Pioletti DP, Browne M, Gregson PJ. Effect of different Ti-6Al-4V surface treatments on osteoblasts behaviour. *Biomaterials* 2002;23(6):1447-54.

Lavos-Valereto IC, Deboni MCZ, Azambuja Jr N, Marques MM. Evaluation of the titanium Ti-6Al-7Nb alloy with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating on growth and viability of cultured osteoblast-like cells. *J Periodontol* 2002;73(8):900-5.

Lecanda F, Avioli LV, Cheng S. Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Biochem* 1997;67(3):386-96.

Lima LA, Fuchs-Wehrle AM, Lang NP, Hämmerle CHF, Liberti E, Pompeu E et al. Surface characteristics of implants influence their bone integration alter simultaneous placement of implant and GBR membrane. *Clin Oral Impl Res* 2003;14:669-79.

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.

Lind M, Eriksen EF, Bunger C. Bone morphogenetic protein-2 but not bone morphogenetic protein-4 and -6 stimulates chemotactic migration of human osteoblasts, human marrow osteoblasts, and U2-OS cells. *Bone* 1996;18(1):53-7.

Lohmann CH, Sagun Jr R, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD, et al. Surface roughness modulates the response of MG63 osteoblast-like cells to 1,25-(OH)2D3 through regulation of phospholipase A2 activity and activation of protein kinase A. *J Biomed Mater Res* 1999;47(2):139-51.

Lowry OH, Rosebrough Nj, Farr AI, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75

Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford Jr J et al.. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res* 1995;29(3):389-401.

Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clin Oral Implants Res* 2005;16(6):650-6.

Montanaro L, Arciola CR, Campoccia D, Cervellati M. In vitro effects on MG63 osteoblast-like cells following contact with two roughness-differing fluorohidroxyapatite-coated titanium alloys. *Biomaterials* 2002;23(17):3651-9.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival applications to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immun Meth* 1983;65:55-63.

Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez BS, Arvidson K. Determining optimal surface roughness of TiO2 blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Implants Res* 2001;12(5):515-25.

Noth U, Hendrich C, Merklein F, Altvater T, Rader CP, Schtze N, et al. Standardized testing of bone implant surfaces with an osteoblast cell culture system. II. Titanium surfaces of different degrees of roughness. *Biomed Tech* 1999;44(1-2):6-11.

Ong JL, Bess EG, Bessho K. Osteoblast progenitor cell responses to characterized titanium surfaces in the presence of bone morphogenetic protein-atelo peptide type I collagen in vitro. *J Oral Implantol* 1999;25(2):95-100.

Ong JL, Carnes DL, Cardenas HL, Cavin R. Surface roughness of titanium on bone morphogenetic protein-2 treated osteoblast cells in vitro. *Implant Dent* 1997;6(1):19-24.

Perizzolo D, Lacefield WR, Brunette DM. Interaction between topography and coating in the formation of bone nodules in cultura for hydroxyapatite- and titanium-coated micromachined surfaces. *J Biomed Mater Res* 2001;56(4):494-503.

Puleo DA. Dependence of mesenchymal cell responses on duration of exposure to bone morphogenetic protein-2 in vitro. *J Cell Physiol* 1997;173(1):93-101.

Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem* 1996;29:225-9

Rosa AL, Beloti MM. Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. *Braz Dent J* 2003a;14(1):16-21.

Rosa AL, Beloti MM. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. *Clin Oral Implants Res* 2003b;14(1):43-8.

Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J, et al. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *J Dent Res* 2003;82(5):372-6.

Schwartz Z, Kieswetter K, Dean DD, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-surface interface during regeneration. *J Periodont Res* 1997;32(1):166-71.

Schwartz Z, Lohmann CH, Oefinger J, Bonewald LF, Dean DD, Boyan BD. Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv Dent Res* 1999;13:38-48.

Schwartz Z, Lohmann CH, Sisk M, Cochran DL, Sylvia VL, Simpsom J et al.. Local factor production by MG63 osteoblast like cells in response to surface roughness and 1,25-(OH)2D3 is mediated via protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathways. *Biomaterials* 2001;22(7):731-41.

Sisk MA, Lohmann CH, Sylvia VL, Simpson JP, Dean DD, Boyan BD, et al. Inhibition of cyclooxygenase by indomethacin modulates osteoblast response to titanium surface roughness in a time-dependent manner. *Clin Oral Impl Res* 2001;12(1):52-61.

Takuwa Y, Ohse C, Wang EA, Wozney JM, Yamashita K. Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174(1):96-101.

Thies RS, Bauduy M, Ashton BA, Kurtzberg L, Wozney JM, Rosen V. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology* 1992;130:1318-24.

Thomas KA, Cook SD. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J Biomed Mater Res* 1985;19:875-901.

Togashi AY, Cirano FR, Marques MM, Pustiglioni FE, Lima LAPA. Characterization of bone cells obtained from the calvaria of neonatal rats (osteo-1) after serial culture. *J Applied Science* 2007. No prelo.

Urist MR, DeLange RJ, Finerman GAM. Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 1983;220(4598):680-6.

Valcourt U, Ronzler MC, Winkler P, Rosen V, Herbage D, Mallein-Gerin F. Different effects of bone morphogenetic proteins 2, 4, 12 e 13 na expressão de marcadores de cartilagem e de osso na linhagem celular de condrócitos MC615. *Exp Cell Res* 1999;251(2):264-74.

Van den Dolder J, de Ruijter AJ, Spauwen PH, Cansen JA. Observations on the effect of BMP-2 on rat bone marrow cells cultured on titanium substrates of different roughness. *Biomaterials* 2003;24(11):1853-60.

Vercaigne S, Wolke JGC, Naert I, Jansen JA. Histomorphometrical and mechanical evaluation of titanium plasma-spray-coated implants placed in the cortical bone of goats. *J Biomed Mater Res* 1998;41(1):41-8.

Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B. Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminum oxide. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11(1):38-45.

Wieland M, Chehroudb B, Textor M, Brunette DM. Use of Ti-coated replicas to investigate the effects on fibroblast shape of surfaces with varying roughness and constant chemical composition. *J Biomed Mater Res* 2002;60(3):434-44.

Wozney JM. The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. *J Periodontol* 1995;66(6):506-10.

Xavier SP, Carvalho PSP, Beloti MM, Rosa AL. Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. J Dent 2003;31(3):173-80.

Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. J Cell Biol 1991;113(3):681-7.

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 2005;74A:49-58.

Zhao G, Raines AL, Wieland M, Schwartz Z, Boyan BD. Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. Biomaterials 2007;28(18):2821-9.

Zhu X, Chen J, Scheideler L, Reichl R, Geis-Gerstorfer J. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. Biomaterials 2004;25:4087-103.

Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J, Wieland M, Landolt D et al.. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. Biomaterials 2005;26(14):1837-47.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo

PARECER nº 171/03
Protocolo 175/03

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "*Influência da proteína morfogenética óssea recombinante-2 (rhBMP-2) na adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos cultivados sobre superfícies de titânio com diferentes rugosidades*", de responsabilidade do Professor Doutor Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais (parciais ou finais, em função da duração da pesquisa) referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 13 de outubro de 2003.

Prof^a Dr^a **ROSA HELENA MIRANDA GRANDE**
Coordenadora do CEP-FOUSP