ADRIANE YAEKO TOGASHI

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUPERFÍCIES DE TITÂNIO NA
ADESÃO, PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS
SEMELHANTES A OSTEOLASTOS EM CULTURAS, NA
PRESENÇA OU NÃO DE PROTEÍNA MORFOGENÉTICA
ÓSSEA-7 (BMP-7)**

São Paulo

2007

Adriane Yaeko Togashi

**Influência de diferentes superfícies de titânio na adesão,
proliferação e diferenciação de células semelhantes a osteoblastos
em culturas, na presença ou não de proteína morfogenética
óssea-7 (BMP-7)**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título
de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências Odontológicas.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Assoc. Luiz Antonio Pugliesi Alves
de Lima

São Paulo

2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

Togashi AY. Influência de diferentes superfícies de titânio na adesão, proliferação e diferenciação de células semelhantes a osteoblastos em culturas, na presença ou não de proteína morfogenética óssea-7 (BMP-7) [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2007.

São Paulo, / /

Banca Examinadora

1) Prof.(a) Dr.(a) Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima

Titulação: Livre-Docente

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

Meu reconhecimento e minha sincera gratidão por me ensinarem que humildade e dedicação são virtudes que engrandecem as pessoas e por tudo que aprendi com eles.

Aos meus pais, Armando e Yoko por tantas lições de vida.

Aos meus irmãos Cris e Emer

Pelo amor, carinho, compreensão e constante incentivo.

Ao Clade

Pelo apoio incontestável, a abnegação e doação nestes últimos anos. Sua presença e amor foram determinantes para a conclusão desta etapa de minha vida.

A vocês, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima, orientador deste trabalho. Agradeço por sempre instigar a busca de novos conhecimentos científicos e despertar meu senso crítico à Odontologia. Além da presença constante, inusitada dedicação e perfeccionismo na orientação de cada detalhe da tese.

Ao Professor Francisco Emílio Pustiglioni, coordenador do curso de pós-graduação. Agradeço pelo apoio, pelo incentivo e pela honestidade profissional transmitida no dia-a-dia e, acima de tudo, por perceber o melhor de cada um e, acreditar e fazer crer que o amor e dedicação à profissão são sinônimos de sucesso. Esta foi a maneira mais simples, humilde e honesta de lhe dizer obrigado.

Aos Professores, Márcia Martins Marques e Fernando Neves Nogueira, pela fundamental contribuição para a realização deste trabalho, ao ceder instalações e equipamentos dos laboratórios de Cultivo Celular do Departamento de Dentística, e de Bioquímica Oral do Departamento de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para que a cultura de osteoblastos e análises do projeto de tese fossem viabilizadas. Em especial, agradeço a Profa. Márcia Martins Marques pela valiosa e decisiva colaboração, disponibilidade nos momentos de dúvida e orientação no decorrer deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Estomatologia, Fábio Daumas Nunes, Décio dos Santos Pinto Júnior e Moacyr Domingos Novelli pela colaboração e disponibilidade durante as etapas de elaboração e realização deste trabalho.

Aos Professores Adalberto Luiz Rosa e Marcio Mateus Beloti por nos receber de braços abertos no laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Agradeço suas sugestões, as quais vieram em muito enriquecer este trabalho de pesquisa.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia, Roberto Lotufo, Giorgio de Micheli, José Hildebrando Todescan, Giuseppe Alexandre Romito, Cláudio Mendes Pannuti, Marco Georgetti e Silvia Rosana Carneiro (*in memoriam*) pelo exemplo de docentes, pesquisadores e clínicos e, pelo bom convívio durante estes anos.

Aos colegas de curso Cássia, Carlinha, Pri, Val, Verô, Fábio, Giovane, Hsu, Ivan e Ricardo pela amizade que sempre guardarei e estimularei com grande carinho. Ao meu parceiro de laboratório Fabiano, por compartilhar os feriados e os longos períodos no laboratório. Não poderia esquecer dos vários momentos decisivos de elaboração e execução do projeto que encaramos com seriedade e paciência.

Aos funcionários da Disciplina de Periodontia, Márcia e Mara, do Departamento de Estomatologia, Vera, e da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo pela solicitude constante.

Aos técnicos e pós-graduandos dos laboratórios de Cultivo Celular do Departamento de Dentística, Mari, Sônia, Sueli e Lorena; de Bioquímica Oral do Departamento de Materiais Dentários, Douglas e Emily e de Patologia Bucal do Departamento de Estomatologia, Patrícia, pela paciência, disponibilidade e ensinamentos adquiridos.

Aos colegas de disciplina da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Adriane, Íris, Carlos, Patrícia, Lucinara, Silvia e Formigueri por comungarem os mesmos ideais e terem suprido minha ausência.

À Fabiana Scarparo Naufel, Diretora do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UNIOESTE pela confiança em mim depositada.

Ao Coordenador do Colegiado de Odontologia, Diretor do Campus – Cascavel e Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da UNIOESTE pelo auxílio e por terem permitido minha presença neste curso de Pós-Graduação.

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente participaram na realização deste trabalho.

Togashi AY. Influência de diferentes superfícies de titânio na adesão, proliferação e diferenciação de células semelhantes a osteoblastos em culturas, na presença ou não de proteína morfogenética óssea-7 (BMP-7) [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2007.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das características química e de rugosidade da superfície de titânio sobre a adesão, proliferação e diferenciação de células semelhantes aos osteoblastos de rato (Osteo-1), cultivados em meio de cultura adicionado de BMP-7. MATERIAL E MÉTODO: Células Osteo-1 foram cultivadas sobre discos de titânio com superfícies: 1) lisa, 2) jateada por areia de grânulos grandes e atacada por ácido (SLA) e 3) rugosa SLA e quimicamente modificada e hidrofílica (SLAactive) na presença ou ausência de 20ng/ml de rhBMP-7 no meio de cultura. A adesão e viabilidade das células Osteo-1 foram analisadas após 24 horas de contato com as superfícies em estudo. A diferenciação celular foi avaliada através da análise do conteúdo de proteína total (PT), conteúdo de colágeno, atividade de fosfatase alcalina (ALPase), em 7, 14 e 21 dias, e da formação de matriz mineralizada, em 21 dias. Os resultados foram comparados pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. RESULTADOS: A adesão ($p=0.3485$) e a viabilidade ($p=0.5516$) celular, o conteúdo de colágeno ($p=0.1165$) e a formação de matriz mineralizada ($p=0.5319$) não foram afetados pelas diferentes superfícies ou pela adição de rhBMP-7 ao meio. Células Osteo-1 cultivadas sobre superfície SLA apresentaram um aumento significativo no conteúdo de proteína total

aos 21 dias. A relação atividade de ALPase/PT ($p=0.0000$) foi afetada pelos tratamento e tempo. CONCLUSÃO: Os resultados sugerem que a adição de rhBMP-7 ao meio de cultura não promoveu efeito sobre a adesão, proliferação e diferenciação de células semelhantes a osteoblastos nas diferentes superfícies testadas. Todas as superfícies de titânio testadas permitiram uma completa expressão do fenótipo de osteoblasto como a mineralização da matriz pela célula Osteo-1.

Palavras-Chave: Diferenciação celular; Fosfatase alcalina; Osseointegração; Osteoblastos; Titânio; Topografia

Togashi AY. Influence of different titanium surface on the adhesion, proliferation and differentiation of osteoblast-like cells cultured in the presence or absence of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) [Thesis of Doctoral]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2007.

ABSTRACT

The aim of the present study was to assess the influence of the chemical characteristics and roughness of titanium surfaces on the attachment, proliferation and differentiation of osteoblast-like cells cultured in medium supplemented with bone morphogenetic protein-7 (BMP-7). METHODS: Osteo-1 cells were grown on titanium discs presenting the following surfaces: 1) machined surface, 2) coarse grit-blasted and acid-etched (SLA), and 3) modified SLA (SLAactive) in the absence or presence of 20 ng/ml rhBMP-7 in culture medium. The attachment and viability of osteo-1 cells were evaluated after 24 h. Cell differentiation was evaluated by analysis of total protein content (TP), collagen content and alkaline phosphatase (ALPase) activity at 7, 14 and 21 days and of mineralized matrix formation at 21 days. The results were compared by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. RESULTS: Cell attachment ($p=0.3485$), cell viability ($p=0.5516$), collagen content ($p=0.1165$) and mineralized matrix formation ($p=0.5319$) were not affected by the different surfaces or by the addition of rhBMP-7 to the medium. Osteo-1 cells cultured on SLA surface presented a significant increase in TP at 21 days. The ALPase/TP ratio ($p=0.0000$) was affected by treatment and time. CONCLUSION: The results suggest that the addition of rhBMP-7 to the culture medium did not promote any

effect on the adhesion, proliferation or differentiation of osteoblast-like cells grown on the different surfaces tested. All titanium surfaces analyzed permitted the complete expression of the osteoblast phenotype such as matrix mineralization by osteo-1 cells.

Keywords: Alkaline phosphatase; Cell differentiation; Osseointegration; Osteoblasts; Titanium; Topography

LISTA DE FIGURAS

- Figura 5.1 - Curva de crescimento das células Osteo-1 em diferentes densidades de plaqueamento, avaliada pelo teste de redução do MTT, após 1, 3, 5, 7 e 10 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em quadruplicata.....48
- Figura 5.2 - Efeito dose-resposta de diferentes concentrações da rhBMP-7 na viabilidade de células Osteo-1, com troca de meio realizada a cada dois dias, avaliado aos 1, 3, 5 e 7 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em quadruplicata.....49
- Figura 5.3 - Efeito da topografia e composição química da superfície dos discos de Ti na presença e na ausência de rhBMP-7, na viabilidade de células Osteo-1, após 24 horas. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em quadruplicata. A viabilidade celular não foi afetada pelos tratamentos ($gl=5$; $F=0,8213$; $p=0,5516$).....50
- Figura 5.4 - Efeito da topografia e da composição química da superfície dos discos de Ti na presença e na ausência de rhBMP-7, sobre a contagem de células Osteo-1 aderidas, em 24 horas. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em quadruplicata. A contagem celular não foi afetada pelo tratamento ($gl=5$; $F=1,20$; $p=0,3485$).....51
- Figura 5.5 - Conteúdo de proteína total produzido pelas células Osteo-1, avaliado aos 7, 14 e 21 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em triplicata. O conteúdo de proteína total foi afetado pelos tratamentos ($gl=5,36$; $F=6,7986$; $p=0,0003$) e pelo período avaliado ($gl=2,36$; $F=226,6926$; $p=0,0000$) da seguinte maneira: C/SLA,21 dias> C/SLA, 14 dias> C/SLA,7dias; C/Liso,14 dias=C/Liso,21 dias> C/Liso,7 dias; C/SLAactive,14 dias=C/SLAactive,21 dias> C/SLAactive,7 dias. Letra diferente representa diferença estatística.....52
- Figura 5.6 - Relação da Atividade de ALPase/ PT de células Osteo-1, avaliada aos 7, 14 e 21 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em quadruplicata. A relação atividade de

ALPase/PT foi afetada pelo tratamento (gl=5,54; F=11,02; p=0,0000) da seguinte maneira: C/SLA > BMP-7/SLA = BMP-7/SLAactive, aos 14 dias. A relação da atividade de ALPase/PT, também, foi afetada pelo período avaliado (gl=2,54; F=131,69; p=0,0000) da seguinte maneira: 21 > 14 > 7 dias. Letra diferente representa diferença estatística.....54

Figura 5.7 - Efeito da topografia da superfície na presença e na ausência de rhBMP-7, na formação de matriz mineralizada por células Osteo-1, em 21 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em quadruplicata. A formação de matriz mineralizada não foi afetada pelo tratamento (gl=5; F=0,9612; p=0,5319).....55

LISTA DE TABELA

Tabela 5.1 - Conteúdo de colágeno produzido pelas células Osteo-1, avaliado aos 7, 14 e 21 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em triplicata. O conteúdo de colágeno não foi afetado pelo tratamento (gl=5,36; F=0,7017; p=0,6279) e pelo período avaliado (gl=2,36; F=2,2659; p=0,1165). Conteúdo de colágeno, expresso como μg de colágeno/ml.....	53
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALPase	(<i>alkaline phosphatase</i>) fosfatase alcalina
ANOVA	análise de variância
Arg	arginina
Asp	aspargina
ATF	ácido trifluoracético
BMP	(<i>bone morphogenetic protein</i>) proteína morfogenética óssea
BMP-7	(<i>bone morphogenetic protein-7</i>) proteína morfogenética óssea-7
col-I	colágeno tipo I
DMEM	meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxiribonucleico
DO	densidade óptica
Dx	dexametasona
EDTA	(<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>) ácido etilenodiaminatetracético di-sódico
ELISA	(<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>) teste imunoenzimático
F	razão entre a fonte de variação entre tratamentos e a fonte de variação dentro dos tratamentos
GI	grau de liberdade
Gly	glicina
h	hora
HA	hidroxiapatita

Hip	hidroxiprolina
min	minutos
MTT	(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) 2,5-difeniltetrazólio)
n	tamanho da amostra
OC	osteocalcina
OP-1	(<i>osteogenic protein-1</i>) proteína osteogênica-1
p	nível de significância
PBSA	(<i>phosphate buffered-saline</i>) solução tampão fosfato salina, sem cálcio e sem magnésio
R _a	rugosidade média aritmética
R _q	rugosidade média quadrática
rpm	rotações por minuto
S _a	desvio médio aritmético de rugosidade
SDS	dodecil sulfato de sódio
SEM	erro padrão da média
Ser	serina
SFB	soro fetal bovino
SLA	(<i>Sand blasted-Large grit-Acid etched</i>) superfície jateada por areia de grânulos grandes e atacada por ácido
SLAactive	superfície rugosa SLA e quimicamente modificada e hidrofílica
S _q	desvio médio quadrático de rugosidade
TGFβ	fator de crescimento transformador beta
Ticp	titânio comercialmente puro
TPS	“plasma <i>spray</i> ” de titânio

LISTA DE SÍMBOLOS

β	beta
Ca	cálcio
CO ₂	dióxido de carbono
cm ²	centímetro quadrado
g	grama
°C	graus Celsius
HCl	ácido clorídrico
H ₂ O ₂	dióxido de hidrogênio (água oxigenada)
H ₃ PO ₄	ácido fosfórico
HNO ₃	ácido nítrico
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
M	molar
μg	micrograma
μl	microlitro
μmol	micromol
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
N	Normal

NaCl	cloreto de sódio isotônico
nm	nanômetro
ng	nanograma
%	porcentagem
P	fosforo
pH	potencial hidrogeniônico
TiO ₂	dióxido de titânio
x g	vezes grama

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Rugosidade e composição química de superfície de titânio.....	21
2.2 Proteína morfogenética óssea-7 ou proteína osteogênica-1.....	26
3 PROPOSIÇÃO.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Cultura de célula.....	32
4.2 Análise da viabilidade celular.....	33
4.2.1 Determinação da densidade celular.....	34
4.2.2 Determinação da concentração de rhBMP-7.....	35
4.3 Discos de titânio.....	36
4.3.1 Preparo das amostras.....	36
4.4 Proteína morfogenética óssea-7 ou proteína osteogênica-1.....	37
4.5 Experimentos e grupos experimentais.....	38
4.5.1 Experimentos.....	38
4.5.2 Grupos experimentais.....	40
4.6 Viabilidade e adesão celular.....	41
4.7 Medida do conteúdo de proteína total.....	42
4.8 Medida do conteúdo de colágeno.....	43
4.9 Medida da atividade de fosfatase alcalina.....	44
4.10 Formação da matriz mineralizada.....	45
4.11 Análise estatística.....	46
5 RESULTADOS.....	47
5.1 Densidade celular.....	47
5.2 Concentração da proteína morfogenética óssea-7	48
5.3 Viabilidade e adesão celular.....	49

5.4 Medida do conteúdo de proteína total.....	51
5.5 Medida do conteúdo de colágeno.....	53
5.6 Medida da atividade de fosfatase alcalina.....	54
5.7 Formação da matriz mineralizada.....	55
6 DISCUSSÃO.....	56
7 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXO.....	72

1 INTRODUÇÃO

Entre os fatores mais relevantes para a integração do implante ao tecido ósseo e, conseqüentemente, à osseointegração, estão diversos aspectos, como a topografia e a rugosidade de superfície, além da composição química e energia de superfície do titânio (MORRA, 2006; TOGASHI; CIRANO; LIMA, 2006; GUÉHENNEC et al., 2007).

Alguns trabalhos têm mostrado que superfícies mais rugosas reduzem a adesão e a proliferação de osteoblastos, mas favorecem sua diferenciação e a formação de nódulos calcificados (LOHMANN et al., 1999; BOYAN et al., 2003; BACHLE; KOHAL, 2004). Adicionalmente, trabalhos em animais mostraram que essas superfícies permitem que a osseointegração ocorra mais rapidamente, além de resultar num maior percentual de contato osso-implante (WENNERBERG; ALBREKTSSON; LAUSMAA, 1996; AMARANTE; LIMA, 2001; BUSER et al., 2004).

Recentemente, alguns novos procedimentos têm sido testados com o objetivo de melhorar ainda mais a resposta do osteoblasto frente à superfície do titânio, os quais poderiam ativar, biologicamente, a superfície de Ti. Para exemplificar podemos citar a adição de fluor à superfície de titânio (BIBBY et al., 2005; COOPER et al., 2006; KIM et al., 2006) e a modificação da reatividade da superfície de Ti, aumentando sua hidrofilia (BUSER et al., 2004; CAI et al., 2005; ZHAO et al., 2005).

Buser et al. (2004) e Zhao et al. (2005), caracterizaram uma superfície SLA modificada, quimicamente ativada, hidrofílica e com ângulo de contato igual à zero.

Esta resultou em níveis de contato osso-implante elevado nas primeiras semanas de osseointegração, favorecendo à neoformação óssea mais rápida. A força de remoção por torque do implante foi mantida em níveis elevados na segunda semana, quando comparada às superfícies hidrofóbicas (SLA e lisa).

Em concordância com os resultados acima, outras modificações químicas da superfície de titânio (DELIGIANNI et al., 2001; ZHAO et al., 2006) influenciaram, diferentemente, a adesão, a proliferação e a diferenciação de osteoblastos, além de exibirem níveis elevados de atividade específica de fosfatase alcalina (ALPase) (ZINGER et al., 2005) e osteocalcina (OC) (ZHAO et al., 2005, 2006).

Ao mesmo tempo, estudos com proteína morfogenética óssea-7 (BMP-7) ou proteína osteogênica-1 (OP-1) mostraram a capacidade deste fator de crescimento em estimular o metabolismo ósseo, *in vitro*, modulando a proliferação e diferenciação de células mesenquimais em linhagens de células formadoras de osso (KNUTSEN et al., 1993; SAMPATHY et al., 1992; YEH et al., 2004). A utilização da BMP-7 provocou elevados níveis de atividade de fosfatase alcalina (ALPase) (KNUTSEN et al., 1993) e a presença de colágeno tipo I (AÇIL et al., 2002).

Considerando que as modificações de rugosidade e das características químicas de superfície e a BMP-7 favorecem a diferenciação de osteoblastos, seria interessante procurar esclarecer se sua associação seria capaz de melhorar ainda mais a diferenciação celular e a formação de nódulos calcificados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Devido à ampla literatura que versa sobre o assunto, para uma melhor compreensão e análise desta pesquisa, a revisão de literatura foi dividida em seções abordando aspectos relacionados com:

1. Rugosidade e composição química de superfície de titânio
2. Proteína morfogenética óssea-7 ou proteína osteogênica-1

2.1 Rugosidade e composição química de superfície de titânio

Diversas técnicas de tratamento de superfície, tais como, oxidação anódica e térmica, deposição térmica a vácuo, deposição química a vapor, processo sol-gel, jateamento, passivação e sinterização à temperatura elevada modificam a rugosidade, a composição química e a espessura da superfície de titânio (KILPADI et al., 1998; BINON, 2000; AMARANTE; LIMA, 2001; BORSARI et al., 2005; SALDANÃ et al., 2005; ADVINCULA et al., 2006).

Além das técnicas de tratamento, medidas de caracterização de superfície (ORSINI et al., 2000; SYKARAS et al., 2000; TOGASHI; MAGINI; BOEHS, 2003) e as técnicas de análise de superfície (SMITH et al., 1991; PLACKO et al., 2000; WIELAND et al., 2001) podem influenciar no resultado dos processos envolvidos na resposta biológica.

As unidades de medida e equipamentos de caracterização da superfície quantificam o grau de rugosidade e descrevem a qualidade da rugosidade de superfície (RATNER; JOHNSTON; LENK, 1987). Wennerberg e Albrektsson (2000) sugeriram três padrões para a avaliação topográfica dos implantes: 1) o equipamento de medida, como por exemplo, o perfilômetro e o interferômetro; 2) o processo de filtagem, que é capaz de separar valores de ondulação e rugosidade e 3) a seleção de parâmetros de medida, sendo os parâmetros de altura (amplitude) preferidos: R_a e R_q para medidas bidimensionais e, S_a e S_q para tridimensionais.

Brunette (1988) observou que as superfícies rugosas, obtidas por meio de diversos tratamentos de superfície, apresentaram comportamento celular distinto em microtopografias diferentes. Mais recentemente, Bachle e Kohal (2004) realizaram uma revisão sistemática da influência de diferentes superfícies de titânio sobre a proliferação, a diferenciação e a síntese de proteína de células MG63. Os autores concluíram que o valor de R_a das superfícies texturizadas de Ticp, em torno de $4\mu\text{m}$, apresentou melhor resposta das células MG63. Nesta situação, elas tenderam a se apresentar mais diferenciadas.

Outro aspecto, o da composição química da superfície, refere-se à estrutura atômica e molecular do material, e é determinada pela camada de óxido (KASEMO, 1983; PARSEGAN, 1983; KASEMO; LAUSMAA, 1988; PLACKO et al., 2000). O tratamento químico como a imersão em NaCl, HNO_3 , H_2O_2 , ou redução ácida com H_2SO_4 , HCl ou H_3PO_4 alteram a densidade da carga da superfície ou microestrutura da superfície para produzir uma camada de TiO_2 mais bioativa (KILPADI et al., 1998; DINIZ et al., 2002; ZHAO et al., 2005).

Apesar do grande número de trabalhos (LINCKS et al., 1998; BOYAN et al., 1998, 2002; DELIGIANNI et al., 2001; KAWAHARA et al., 2004) mostrando a superioridade das superfícies rugosas em relação às superfícies lisas, outros estudos mostraram que o aumento da rugosidade não apresentou nenhum efeito, ou descreveram que o mesmo diminuiu a atividade celular (ANSELME et al., 2000; ANSELME, 2000; ROSA; BELOTI, 2003; XAVIER et al., 2003).

Um dos primeiros estudos que sugeriram que a rugosidade da superfície do implante pode participar na determinação da expressão fenotípica das células, *in vitro*, foi o de Martin et al. (1995). A atividade específica da ALPase em células isoladas diminuiu com o aumento da rugosidade da superfície, exceto para aquelas cultivadas sobre a superfície tratada com jato de areia com partículas grandes, condicionada com ácido clorídrico (HCl) e ácido sulfúrico (H₂SO₄). Atividade de ALPase na camada celular diminuiu em culturas sobre superfície jateada com partículas pequenas e condicionamento com HCl e H₂SO₄ e a superfície TPS (“plasma spray” de Ti) em 24 e 48h.

Boyan et al. (2002), observaram que a proliferação celular diminuiu, enquanto a atividade específica da ALPase e o número de nódulos geralmente aumentaram com o aumento da rugosidade de superfície, aos 14 dias. O conteúdo de Ca e P das camadas celulares não variou com a rugosidade de superfície. Entretanto, a adição de Dx na cultura resultou em conteúdo de Ca aumentado em todas as superfícies. O aumento maior foi visto sobre SLA e TPS. A imagem obtida através de infravermelho de Fourier mostrou forte associação entre mineral e matriz sobre superfícies TPS e SLA, em células tratadas com BMP₂.

Bannister et al. (2002), avaliaram superfícies de Ti, superfície lisa (PT) ($R_a=0.6\mu\text{m}$), SLA ($R_a=3.97\mu\text{m}$) e TPS ($R_a=5.21\mu\text{m}$) e observaram que células sobre superfícies lisas (vidro e PT) não foram afetadas pela produção de OC, entretanto, superfície SLA e TPS apresentaram aumento da ALPase e OC.

Zinger et al. (2004), prepararam e caracterizaram três tipos de superfícies. O primeiro grupo, denominado “nano”, consistiu de amostras planas com rugosidades diferentes na escala submicrométrica, obtidas por condicionamento ácido, oxidação anódica dos poros, polimento e eletropolimento mecânico. O segundo grupo, denominado “micro”, consistiu de superfícies polidas, mecanicamente, com cavidades lisas produzidas, eletroquimicamente, de 10, 30 ou 100 μm . O terceiro grupo, denominado “micro+nano”, consistiu de topografias de superfície na escala de micro e nanômetro, sendo dois tipos de amostra produzidos por condicionamento ácido ou oxidação anódica dos poros e, um terceiro tipo de amostra denominada SLA (“Sand blasted-Large grit-Acid etched”) foi usado como controle. Os autores observaram que não houve diferença, estatisticamente, significativa na densidade de células MG63 entre as superfícies polidas, eletropolidas, anodizadas e condicionadas às 4 e 24 horas e aos 3 dias. Células MG63 foram capazes de adentrar, aderir e proliferar em cavidades de 30 ou 100 μm de diâmetro, mas não reconheceram cavidades de 10 μm de diâmetro. Entretanto, após 5 dias, o número de células foi reduzido sobre a superfície SLA (ZINGER et al., 2005; ZHAO et al., 2006).

Zinger et al. (2005), observaram que a atividade de ALPase e os níveis de OC de células MG63 foram maiores na superfície SLA que em superfícies polidas e

com microcavidades de 10, 30 e 100 μ m. Os autores observaram que estes resultados variaram de acordo com o tamanho e distribuição das cavidades.

Zhao et al. (2005), observaram a proliferação e a diferenciação das células MG63 sobre superfície lisa (PT), SLA e SLA modificada, com composição química de superfície controlada. O número de células sobre superfície SLA e SLA modificada foi menor que sobre a superfície lisa, e o número de células sobre a superfície SLA modificada foi 30% menor que o da superfície SLA. A atividade de ALPase do lisado da camada celular sobre a superfície SLA modificada aumentou mais de 100% comparada à da SLA. A atividade enzimática no lisado de células isoladas foi maior sobre SLA e SLA modificada quando comparada à superfície lisa.

Zhao et al. (2006), observaram que a atividade específica da ALPase das células MG63 cultivadas sobre superfícies lisa, anodizada e condicionada foram semelhantes, e reduzida, sobre superfície SLA. O nível de OC foi afetado pela estrutura da superfície de uma maneira inversamente proporcional ao número de células. O maior nível de OC foi visto em culturas sobre SLA e superfícies condicionadas com microcavidades de 30 μ m.

Zhao et al. (2007), avaliaram três topografias de superfície diferentes: PT-lisa; A-ácido-condicionada e SLA-jateada, ácido-condicionada e as compararam com duas superfícies que continham alta energia de superfície: Amod- ácido-condicionada e modificada e SLAmod- jateada, ácido-condicionada e modificada. Após 6 dias, o número de células MG63 sobre a superfície SLA diminuiu 44% comparado ao da PT. Entretanto, houve uma diminuição no número de células, de aproximadamente 50%, sobre a superfície SLAmod quando comparado com o da superfície SLA. A atividade de ALPase das células cultivadas sobre a superfície

SLAmod diminuiu 60% em relação à superfície SLA. A combinação da alta energia de superfície e da rugosidade da superfície SLAmod acentuou a produção de OC em mais de 250%.

2.2 Proteína morfogenética óssea-7 ou proteína osteogênica-1

A Proteína morfogenética óssea-7 (rhBMP-7), ou proteína osteogênica-1 (rhOP-1) recombinante humana, produzida pela expressão do DNA complementar (cDNA) em células mamárias, foi capaz de induzir formação óssea, *in vitro*, de uma maneira semelhante às preparações de BMP-7 bovina altamente purificadas (SAMPATH et al., 1992). A rhBMP-7 foi capaz de produzir resposta condrogênica e osteoblástica.

Os efeitos biológicos da BMP-7 na osteogênese consistem em estimular a proliferação celular, síntese de colágeno e diferenciação do osteoblasto (CANALIS; ECONOMIDES; GAZZERRO, 2003; GRANJEIRO et al., 2005). Estudos, *in vitro*, como de Sampath et al. (1992), Asahina et al. (1993) e Yeh et al. (2004), observaram dois efeitos osteogênicos da BMP-7: 1) acentua a característica osteoblástica de células semelhantes aos osteoblastos e 2) induz a expressão fenotípica de osteoblasto pelas células osteoprogenitoras.

Os primeiros trabalhos que avaliaram a influência da rhBMP-7 sobre o comportamento ósseo foram de Sampath et al. (1992) e Knutsen et al. (1993). O primeiro, consistiu em produzir hBMP-7 recombinante e demonstrar que o

homodímero deste peptídeo é capaz de promover proliferação celular e estimular a expressão de marcadores do fenótipo osteoblasto em cultura primária de células de calvária de rato. A proteína morfogenética óssea-7 humana à 40ng/ml, aumentou em 3 vezes a proliferação celular e síntese de colágeno e, aumentou em 4 vezes a atividade de ALPase quando comparada ao controle. Vinte cinco ng/ml de hBMP-7 aumentou em 5 vezes a síntese de OC. Na presença de β -glicerofosfato e L-ascorbato, 20ng/ml de hBMP-7 aumentou em 20 vezes o número de nódulos mineralizados. Assim, hBMP-7 foi efetiva em estimular marcadores do fenótipo do osteoblasto.

Knutsen et al. (1993), investigaram o efeito da BMP-7 recombinante humana sobre a proliferação e a diferenciação da célula óssea humana normal e transformada (COH). Proteína morfogenética óssea-7, numa concentração de 3-10 ng/ml, estimulou a incorporação de [3 H]-timidina em células TE85 (células de osteossarcoma), que foi cinco vezes maior que no controle. Da mesma forma, em células COM (células ósseas derivadas de mandíbula), 100 ng/ml de BMP-7 resultou em 1.8 vezes mais proliferação celular que o controle. O número de células TE85 aumentou após 72h de tratamento com 3 ng/ml de BMP-7. Numa dose de 30 ng/ml de BMP-7, a atividade de ALPase foi estimulada em células TE85, 4 vezes mais que no controle. Porém, foi, moderadamente, inibida numa concentração de 100ng/ml de BMP-7 em células COM, sendo 67% em relação ao controle.

Por outro lado, Hardy et al. (2006), demonstraram que não houve aumento significativo na atividade de ALPase de células MG63 tratadas com baixa e alta concentração de BMP-7 e o controle, em 24 e 72 horas. Entretanto, as células tratadas com alta concentração de BMP-7, em 48 horas, mostraram uma diminuição

significante da atividade de ALPase quando comparadas ao controle, no mesmo período. Os tratamentos não tiveram nenhum efeito sobre os níveis de Ca do sobrenadante de células tratadas com concentrações baixa e alta de BMP-7 quando comparadas ao controle, nos períodos de 24, 48 e 72 horas. A proliferação celular do grupo controle e dos grupos tratados com concentrações baixa e alta de BMP-7, foram semelhantes, em 24 e 48 horas.

Vários estudos (ASAHINA et al., 1993; AONO et al., 1995; DEE et al., 1996; AÇIL et al., 2002; EICHNER et al., 2002; YEH; TSAI; LEE, 2002; YEH; ZAVALA; LEE, 2002; IRIE et al., 2003; LEE et al., 2003) têm demonstrado os efeitos celular e molecular da BMP-7 recombinante humana sobre diferentes linhagens celulares. Células ósseas provenientes de medula óssea de rato (AONO et al., 1995), de calvária de rato (ASAHINA et al., 1993; DEE et al., 1996; YEH; ZAVALA; LEE, 2002; LEE et al., 2003; YEH; ZAVALA; LEE, 2006), de osteossarcoma de rato ROS 17/2.8 (IRIE et al., 2003), célula proveniente de camundongo (ASAHINA; SAMPATH; HAUSCHKA, 1996; CHEN; SHEN; KRAEMER, 2001), células mesenquimais pluripotentes (YEH; TSAI; LEE, 2002; YEH; ZAVALA; LEE, 2002), célula de osteossarcoma MG63 (HARDY et al., 2006) e osteoblasto humano (AÇIL et al., 2002; CHAUDHARY; HOFMEISTER; HRUSKA, 2004) cultivadas em diferentes meios de cultura respondem, diferentemente, à BMP-7.

Os trabalhos acima demonstraram que a concentração ótima de rhBMP-7, capaz de estimular a diferenciação osteoblástica, pode diferir de acordo com o tipo celular e condições da cultura. Assim, os efeitos da BMP-7 sobre osteoblastos de rato têm sido estudados no sentido de, também, melhor entender da ação desta proteína em nível celular. Asahina et al. (1993), observaram 120% mais

incorporação de [^3H]-timidina no grupo da BMP-7 no quarto dia de cultivo. Entretanto, não existiram diferenças entre as células tratadas com BMP-7 e o controle. A atividade específica de ALPase foi aumentada 3.4 vezes, numa dose de 40ng/ml de BMP-7 e, 4.5 vezes, em 100ng/ml de BMP-7. A atividade de ALPase foi maior em culturas primárias tratadas com BMP-7 a partir do primeiro dia, que em culturas mais maduras, com 7-13 dias ou culturas subcultivadas, alcançando níveis elevados em 7 dias. A coloração de von Kossa mostrou forte mineralização em culturas tratadas com BMP-7.

Dee et al. (1996), observaram que a ausência ou presença de 100ng/ml de BMP-7 não afetou a adesão do osteoblasto sobre substratos de vidro modificados com peptídeos adesivos bioativos Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS). A presença de 100ng/ml de BMP-7, significativamente, inibiu a proliferação sobre todos os substratos examinados, em 72h. A proteína morfogenética óssea-7, na mesma concentração, promoveu mineralização em 21 dias, em todos os substratos examinados e, a mineralização foi acentuada em cultura de osteoblasto cultivado sobre vidro modificado com peptídeo adesivo RGDS. Estes resultados sugeriram que os efeitos da BMP-7 e o peptídeo adesivo RGDS sobre o substrato combinaram para amplificar a mineralização em culturas de osteoblastos.

Lee et al. (2003), descreveram a caracterização da rhBMP-7 purificada e demonstraram que ela foi capaz de promover proliferação das células de calvária de rato neonatal (CRN). A rhBMP-7 mostrou um estímulo mitogênico, de cerca de 2 e 3 vezes maior, numa dose de 20 e 100ng/ml, respectivamente, em meio livre de soro, quando comparada ao controle. A rhBMP-7 estimulou a atividade específica da ALPase de uma maneira dose-dependente: 2, 4 e 5 vezes em 20, 50 e 100ng/ml de

rhBMP-7, respectivamente. Nas culturas de células CRN, as células positivas à ALPase quase não foram observadas naquelas culturas sem rhBMP-7.

Yeh, Zavala e Lee (2002) mostraram que a adição de 150ng/ml de BMP-7 ao meio de cultura acentuou 4 a 5 vezes mais a atividade de ALPase de células CFR, de calvária de feto de rato, quando comparada ao controle. Os mesmos autores, em 2006, ao utilizarem 200ng/ml de BMP-7, observaram um aumento dose-dependente na atividade de ALPase da célula CFR e a intensidade de marcação do Ca através do vermelho de Alizarina S foi cerca de 10 vezes superior ao controle.

3 PROPOSIÇÃO

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 (Osteo-1) em meio de cultura ao qual se adicionou, ou não, proteína morfogenética óssea-7 (BMP-7).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de célula

A célula Osteo-1 usada, neste experimento, é derivada de tecido ósseo parietal de ratos Wistar albinos recém-nascidos (1 a 4 dias). A cultura primária desta célula foi identificada e caracterizada por Deboni, Jaeger e Araújo, 1996. A célula Osteo-1 foi subcultivada, congelada e a mesma passagem celular foi utilizada para a realização de todo o experimento. Estas células subcultivadas foram caracterizadas por Togashi et al. (2007).

Todas as células utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Cultivo Celular, do Departamento de Dentística, da Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, sob aprovação da Subcomissão de Bioética de Animais da FOUSP, Parecer nº 04/04 (ANEXO A).

As células foram cultivadas em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)¹, contendo soro fetal bovino² a 10% e solução antibiótica-antimicótica³ a 1%. As células foram incubadas em ambiente úmido, a 37°C, e numa atmosfera contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono. O crescimento celular foi monitorado a cada 24 horas utilizando-se de microscópio de fase invertido⁴.

¹ Cultilab, Campinas, SP, Brazil.

² Cultilab, Campinas, SP, Brazil.

³ Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA.

⁴ Nikon TMS, Nikon, Japan.

Os subcultivos foram feitos quando as células atingiram a subconfluência. O meio de cultura do frasco ⁵ de 75cm² foi aspirado, e a monocamada celular foi lavada duas vezes com solução tampão fosfato salina, sem cálcio e sem magnésio (PBSA), pH 7,2. A seguir, as células foram separadas com 2ml de uma solução contendo ácido etilenodiaminatetracético di-sódico (EDTA) 1 mM e tripsina⁶ 0,25% durante 2 minutos a 37°C. A tripsina foi, então, inativada com 5ml de meio de cultura contendo soro fetal bovino. As células em suspensão foram transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas a 1000 rpm ou 300 xg durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuspenso em 1ml de meio DMEM, e a suspensão das células foi replaqueada em novos frascos de cultivo até a obtenção do número suficiente de células para todo o experimento. Para a manutenção da viabilidade das células, a troca do meio de cultivo dos frascos foi feita a cada dois dias (FRESHNEY, 2000; LAVOS-VALERETO et al., 2002).

4.2 Análise da viabilidade celular

A determinação da viabilidade da célula Osteo-1 foi realizada através da análise da atividade mitocondrial das células pelo teste de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio).

⁵ Frasco 75cm², Corning, NY, USA.

⁶ Cultilab, Campinas, SP, Brazil.

O teste de redução do MTT quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e, então, sua concentração é determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro, com filtro de 562nm (MOSMANN, 1983). Para a realização do teste foram preparados os reagentes A e B. O reagente A é composto por 0,05g de MTT⁷ em 10ml de PBSA e, o reagente B, é constituído por 1g de dodecil sulfato de sódio⁸ (SDS) em 10 ml de HCl 0,01M.

Os meios de cultura dos poços foram aspirados e substituídos por 100µl de meio DMEM. Dez microlitros do reagente A, foi adicionado em cada poço teste, incluindo os poços sem células, que serviram de controle negativo para a leitura no espectrofotômetro⁹. Depois de 4h de incubação com o reagente A, em estufa a 37° C e protegido da luz com folha de alumínio, 100µl do reagente B foi adicionado a cada poço. Usando pipetador multicanal essa solução foi, gentilmente, homogeneizada. As culturas retornaram para incubação em estufa¹⁰, 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 ELISA⁹, em filtro de 562nm.

4.2.1 Determinação da densidade celular

⁷ CalBioChem, Canadá.

⁸ QBioGene, USA.

⁹ Biotrak II, Amersham Biosciences, England.

¹⁰ REVCO ULTIMA, Asheville, NC, USA.

Para avaliar a curva de crescimento da célula Osteo-1, densidades celulares diferentes foram plaqueadas em placas de 96 poços¹¹ em meio DMEM contendo SFB a 10%. O período de avaliação foi de 1, 3, 5, 7 e 10 dias. E as densidades de plaqueamento utilizadas foram as seguintes: 5×10^2 , 10^3 , 2×10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 2×10^4 e 6×10^4 células.

4.2.2 Determinação da concentração da rhBMP-7

Células Osteo-1, em uma densidade de 5×10^2 células por poço, foram cultivadas em placas de 96 poços¹¹. Foi adicionado ao meio de cultura DMEM contendo SFB a 10%, às seguintes concentrações: 4ng/ml, 10ng/ml, 20ng/ml, 50ng/ml e 100ng/ml de rhBMP-7.

As concentrações utilizadas no experimento foram obtidas por diluições seriadas em meio de cultura DMEM, contendo soro fetal bovino (SFB) a 10%, a partir da solução estoque, de 100µl.

A resposta das células Osteo-1, cultivadas em meio condicionado com concentrações e tempos diferentes de aplicação da rhBMP-7, foi avaliada durante 1, 3, 5 e 7 dias. Esta resposta celular foi mensurada após a adição da rhBMP-7 a cada 2 dias, no momento da troca do meio de cultura, durante todo o período avaliado.

Os poços contendo meio com SFB a 10% serviram como controle.

¹¹ TPP, Switzerland, Europe.

As concentrações da rhBMP-7 utilizadas neste estudo, se basearam em trabalhos anteriores (AONO et al., 1995; ASAHINA et al., 1993; ASAHINA; SAMPATH; HAUSCHKA, 1996; DEE et al., 1996; MARTINOVIC et al., 2006; SAMPATH et al., 1992; YEH; TSAI; LEE, 2002; YEH et al., 2004), onde a rhBMP-7 tem sido aplicada ,*in vitro*, numa concentração de 4 a 100ng/ml.

4.3 Discos de titânio

4.3.1 Preparo das amostras

Discos de titânio manufaturados, para terem superfície idêntica àquelas usadas comercialmente nos implantes odontológicos, foram utilizados no experimento. Os discos de titânio comercialmente puro grau 2 ¹² foram preparados com 1mm de espessura e 15mm de diâmetro. Os discos foram fabricados, processados e fornecidos pelo Instituto Straumann AG¹³, com as seguintes topografias de superfície: 1. superfície lisa, 2. superfície rugosa SLA (jateada por areia de grânulos grandes e atacada por ácido) e 3. superfície rugosa SLA e quimicamente modificada e hidrofílica (SLAactive).

¹² ASTM F67, "Titânio sem liga para aplicações de implantes cirúrgicos".

¹³ Institut Straumann AG, Waldenburg, Switzerland.

A caracterização da topografia e composição química das superfícies dos discos encontra-se descrita nos trabalhos de Buser et al. (2004), Zinger et al. (2005) e Zhao et al. (2005, 2006).

Previamente ao cultivo celular, os discos de superfície lisa e SLA foram lavados completamente, enxaguados com água deionizada, neutralizados em solução de bicarbonato de sódio a 5% ¹⁴, enxaguados em água deionizada por 3 períodos de 5 minutos, ultrasonicamente, e esterilizados por autoclavagem (LOHMANN et al., 1999; BOYAN et al., 2002).

Os discos com superfície SLAactive foram fornecidos em frascos esterilizados por irradiação gama contendo solução isotônica de cloreto de sódio (NaCl) conforme descrito por Zhao et al. (2005).

4.4 Proteína morfogenética óssea-7 ou proteína osteogênica-1

A proteína morfogenética óssea utilizada no estudo foi a rhBMP-7 proveniente da SIGMA¹⁵. A rhBMP-7 é fornecida com aproximadamente 10 µg de proteína liofilizada de uma solução em acetonitrilo a 33% e ácido trifluoracético a 0.1% (ATF). A proteína foi reconstituída usando ácido clorídrico¹⁶ (HCl), 4mM, esterilizado, contendo, no mínimo, soro fetal bovino a 0.1%, resultando em 10 frascos da solução estoque com 100µl de rhBMP-7.

¹⁴ Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA.

¹⁵ Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA.

¹⁶ CAAL, São Paulo, Brazil.

Baseado em estudo prévio de dosagem de rhBMP-7 (ver página 48), a dose de 20ng/ml de rhBMP-7 adicionada ao meio de cultura com a troca do meio realizada a cada 2 dias, foi considerada adequada e biocompatível para uso no experimento, uma vez que não inibiu a proliferação celular no primeiro dia de cultivo, ou seja, no início do processo proliferativo e, reduziu a proliferação celular em estágios posteriores de diferenciação, aos 5 e 7 dias.

4.5 Experimentos e grupos experimentais

4.5.1 Experimentos

Cada disco de Ti foi acondicionado no interior do poço de placas de 24 poços¹⁷ para a análise de viabilidade, de adesão, de proliferação e de diferenciação de osteoblastos, da seguinte maneira:

- Análise de viabilidade e de adesão celular (24h).
- Análises do conteúdo de proteína total, do conteúdo de colágeno e da atividade de fosfatase alcalina (7, 14 e 21 dias).
- Análise da formação de matriz mineralizada (21 dias).

¹⁷ Corning, NY, USA.

Como tínhamos seis grupos experimentais para cada análise, foram utilizados 24 discos por análise. Assim, para a realização das análises, em 5 períodos diferentes, foram necessários um total de 120 discos no experimento.

Para todas as análises acima, células Osteo-1 subconfluentes e cultivadas nos frascos de 75cm² foram separadas através de tripsinização (1mM EDTA e 0.25% de tripsina) e, após a obtenção da suspensão das células, estas, foram centrifugadas por 5 minutos a 1000rpm ou 300 xg. O precipitado das células foi ressuspenso em 10ml de DMEM. Cem microlitros desta suspensão de células foram transferidos para um novo tubo eppendorf¹⁸, onde foi adicionado 100µl de azul de Trypan a 1%¹⁹. As duas câmaras de um hemocítômetro²⁰ receberam essa nova suspensão de células, as quais foram contadas sob microscópio de fase invertido. O número total de células viáveis originárias do frasco foi obtido através da seguinte equação matemática: Número total de células viáveis contadas x diluição no azul de Tripán x 10⁴ / Número de quadrados do hemocítômetro usados para contagem.

Baseado nos resultados de estudos prévios de densidade celular (ver página 47), as células Osteo-1 foram plaqueadas em placas de 24 poços, contendo os discos de Ti, numa densidade celular de 3 x 10³ células por poço.

Após duas horas do plaqueamento, a dosagem de 20ng/ml de rhBMP-7 foi adicionada ao meio de cultura, sendo a troca do mesmo realizada a cada dois dias nos grupos contendo o fator de crescimento.

As células foram incubadas em ambiente úmido, a 37°C, e numa atmosfera contendo 95% de ar atmosférico e 5% de dióxido de carbono (CO₂). Em cada placa,

¹⁸ Corning, NY, USA.

¹⁹ Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA.

²⁰ Neubauer Improved 1492, Beichert Bright-line, Horsham, USA.

os poços não ocupados pelos grupos teste, foram usados como controle das condições da cultura e monitorados através do microscópio de fase invertido.

Todos os procedimentos de limpeza e esterilização dos discos com superfície lisa e SLA, o cultivo das células Osteo-1 e as análises do experimento foram realizados nos laboratórios de Cultura de Células do Departamento de Dentística e de Bioquímica Oral do Departamento de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

4.5.2 Grupos experimentais

Grupo C/Liso – células Osteo-1 cultivadas sobre discos lisos e com o meio sem fator de crescimento (n=4).

Grupo C/SLA – células Osteo-1 cultivadas sobre discos rugosos SLA e com o meio sem fator de crescimento (n=4).

Grupo C/SLAactive – células Osteo-1 cultivadas sobre discos rugosos e com composição química modificada SLAactive e com o meio sem fator de crescimento (n=4).

Grupo BMP-7/Liso – células Osteo-1 cultivadas sobre discos lisos e com o meio contendo rhBMP-7 (n=4).

Grupo BMP-7/SLA – células Osteo-1 cultivadas sobre discos rugosos SLA e com o meio contendo rhBMP-7 (n=4).

Grupo BMP-7/SLAactive – células Osteo-1 cultivadas sobre discos rugosos e com composição química modificada SLAactive e com o meio contendo rhBMP-7 (n=4).

4.6 Viabilidade e adesão celular

Para a análise de viabilidade e de adesão celular, os dados foram obtidos das contagens de células aderidas aos discos de titânio, nos seis grupos experimentais, em quadruplicata. Após um dia de plaqueamento o meio de cultura foi removido e os poços contendo os discos foram lavados, duas vezes, com solução tampão fosfato salina, sem cálcio e sem magnésio (PBSA), a 37°C, para eliminar células não inseridas. As células aderidas às superfícies dos discos foram, enzimaticamente, liberadas nos poços pela adição de 1ml de solução contendo EDTA 1mM e tripsina 0,25%. Aliquotas de 100µl desta solução homogeneizada em DMEM foram transferidas para tubos de eppendorf contendo o mesmo volume de azul de trypan 1%. Células viáveis e não viáveis foram contadas utilizando o hemocitômetro.

A adesão celular foi expressa como o número de células por poço obtido pela equação descrita anteriormente (página 39).

O número de células viáveis foi obtido excluindo-se as células mortas. Somente as células mortas apareceram coradas em azul, pela penetração do azul de Trypan a 1%, devido às lesões na membrana celular. O percentual da viabilidade

celular foi obtido, dividindo-se o número de células viáveis (não coradas) pelo número total de células (coradas e não coradas) e o resultado, multiplicado por 100.

4.7 Medida do conteúdo de proteína total

A dosagem do conteúdo de proteína total (PT) na cultura para todos os grupos experimentais foi calculada de acordo com o método de Lowry modificado (LOWRY et al., 1951).

Após 7, 14 e 21 dias do cultivo dos osteoblastos-símile sobre todos os tipos de discos com e sem rhBMP-7, o meio de cultura dos poços foi removido, os poços lavados duas vezes com PBSA aquecida, a 37°C, e preenchidos com 2 ml de água mili Q. Após três ciclos de um tratamento térmico, colocando as placas de 24 poços a uma temperatura de – 70° C e, em seguida, na estufa, a 37° C, 1 ml da água mili Q, de cada poço, foi transferido para tubos de ensaio, devidamente identificados, e misturado com 1 ml de solução de Lowry, composta por uma solução alcalina, solução de sulfato de cobre e solução de tartarato de sódio²¹. Os tubos de ensaio foram mantidos em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse período, foi adicionado, em cada tubo, 0,5 ml da solução de reagente de fenol de Folin-Ciocalteu²² e, novamente, deixados em repouso à temperatura ambiente, por 30 minutos, para permitir o desenvolvimento da coloração. Em seguida, a

²¹ Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA.

²² Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA.

absorbância de cada tubo foi medida em espectrofotômetro²³, utilizando o comprimento de onda de 680 nm. O conteúdo de PT, em cada poço foi calculado com base em uma curva padrão, em µg/ml, utilizando solução de albumina bovina²⁴.

A medida do conteúdo de proteína total foi utilizada para inferir, indiretamente, a proliferação das células Osteo-1 cultivadas sobre as diferentes superfícies adicionadas ou não de BMP-7 após 7, 14 e 21 dias.

4.8 Medida do conteúdo de colágeno

O conteúdo de colágeno, ou medida da hidroxiprolina (Hip), foi calculado seguindo o método modificado de Reddy e Enwemeka (REDDY; ENWEMEKA, 1996). Todos os grupos experimentais foram avaliados aos 7, 14 e 21 dias.

Amostras das mesmas soluções utilizadas para quantificar a PT e ALPase foram liofilizadas e diluídas em 100 µl de HCl 6N. Estas amostras foram, então, hidrolisadas em autoclave a 120°C por 30 minutos. Após este procedimento, 0,9 ml de cloramina T²⁵ foram adicionados ao hidrolisado, misturado e os tubos foram mantidos à temperatura ambiente, por 25 minutos, para permitir a oxidação. Após este período, 1 ml de reagente de Ehrlich, constituído por p-dimetilaminobenzaldeído²⁶ e solução de propanol/ácido perclórico, foi adicionado em todas as amostras que foram incubadas por 20 minutos, a 65°C. Em seguida, a

²³ DU 800 - Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA.

²⁴ Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA.

²⁵ Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA.

²⁶ Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA.

absorbância foi medida em espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 550 nm. O conteúdo de Hip foi calculado a partir de uma curva padrão do colágeno²⁷ e dado em µg de colágeno/ml.

4.9 Medida da atividade de fosfatase alcalina

A atividade de fosfatase alcalina (ALPase) foi avaliada através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato (BELOTI; BELLESINI; ROSA, 2005; SCHWARTZ FO et al.,2007), para todos os grupos experimentais, aos 7, 14 e 21 dias. A medida foi realizada segundo as instruções do fabricante de um kit comercial²⁸. Em todos os tubos de ensaio branco, padrão e testes foram adicionados 50 µl de substrato e 0,5 ml de tampão. Apenas no tubo padrão foi acrescentado 50 µl da solução padrão. Os tubos foram mantidos em banho-maria, a 37°C, por 2 minutos. Em seguida, em cada tubo teste, foram adicionados, 50 µl da água mili Q, dos mesmos poços utilizados para medida do conteúdo de PT, e os tubos foram mantidos a 37°C, por 10 minutos. Após esse período, dois mililitros de reagente de cor foram adicionados nos tubos branco, padrão e testes. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 580 nm. A atividade de ALPase, foi expressa em µmol de

²⁷ Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA.

²⁸ Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil.

timoftaleína/ μ g de proteína.

4.10 Formação da matriz mineralizada

Para a avaliação da formação de matriz mineralizada aos 21 dias, o meio de cultura foi removido e os poços com os discos foram lavados duas vezes com PBSA aquecida, a 37°C. Depois de 24 horas da fixação das células inseridas à superfície do disco em solução fixadora de formalina tamponada²⁹, a 10%, as células foram desidratadas através de uma série graduada de álcoois: álcool a 30%, 50%, 70%, 95% e 100%. Em seguida, foram processadas pela coloração com vermelho de alizarina S³⁰ que cora áreas de mineralização ricas em cálcio (BELOTI; BELLESINI; ROSA, 2005; SCHWARTZ FO et al., 2007).

A superfície dos discos foi analisada utilizando o microscópio SZ-CT Olympus³¹ sob luz direta, com objetiva de 40X. Dez campos microscópicos por disco foram selecionados de forma padronizada. Foram obtidas micrografias de 10 áreas de cada disco, assim localizadas: dois campos centrais e oito campos periféricos, 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 Tool³². A quantidade de matriz mineralizada

²⁹ MEDMAT, Matão, SP, Brazil.

³⁰ Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA.

³¹ SZ-CT Olympus, Japan.

³² University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA.

formada foi calculada como porcentagem da área mineralizada do valor médio das áreas analisadas de cada disco.

4.11 Análise estatística

Os dados obtidos de cada grupo, foram tratados, estatisticamente, utilizando o programa BioEstat 3.0³³. Os dados foram tratados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors para análise da normalidade, foram comparados pela análise de variância (ANOVA) e foram apresentados como média $\pm$ o erro padrão da média (SEM). O teste de Tukey foi aplicado, quando apropriado. O nível de significância foi de 5% ($p \leq 0,05$).

³³ Sociedade Civil Mamirauá, CNPq, Conservation International, Belém, Brazil.

5 RESULTADOS

5.1 Densidade celular

A curva de crescimento da densidade de plaqueamento de 5×10^2 células/poço, em placas de 96 poços, apresentou comportamento linear e progressivo e não atingiu confluência durante o período avaliado (Figura 5.1). Considerando que os poços da placa de 24 poços, com diâmetro compatível ao tamanho dos discos de titânio, apresentam área, aproximadamente, seis vezes maior que as placas de 96 poços e as células deveriam ser cultivadas por 21 dias, foi definido como densidade celular adequada para as placas de 24 poços, 3×10^3 células/poço.

Figura 5.1 - Curva de crescimento das células Osteo-1 em diferentes densidades de plaqueamento, avaliado pelo teste de redução do MTT, após 1, 3, 5, 7 e 10 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em quadruplicata

5.2 Concentração da proteína morfogenética óssea-7

No primeiro dia de cultura, as concentrações de 10 e 20ng/ml de rhBMP-7, apresentaram viabilidade celular, estatisticamente superior ao controle (Figura 5.2). A viabilidade das células Osteo-1, em meio de cultura com 4, 10, 20 e 50ng/ml de rhBMP-7 com troca realizada a cada dois, após 3, 5 e 7 dias, foi, estatisticamente inferior ao controle, enquanto que com 100ng/ml de rhBMP-7 não mostrou diferença em relação ao controle, no terceiro e sétimo dia (Figura 5.2).

Figura 5.2 - Efeito dose-resposta de diferentes concentrações da rhBMP-7 na viabilidade de células Osteo-1, com troca de meio realizada a cada dois dias, avaliado aos 1, 3, 5 e 7 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em quadruplicata (gl=5,72; F=131.32; p=0,0000)

5.3 Viabilidade e adesão celular

No primeiro dia após o plaqueamento, a viabilidade celular (Figura 5.3) e a contagem de células aderidas (Figura 5.4) não demonstraram diferença, estatisticamente, significativa entre o grupo tratado e o não tratado com rhBMP-7.

Figura 5.3 - Efeito da topografia e composição química da superfície dos discos de Ti na presença e na ausência de rhBMP-7, na viabilidade de células Osteo-1, após 24 horas. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em quadruplicata. A viabilidade celular não foi afetada pelos tratamentos ($gl=5$; $F=0,8213$; $p=0,5516$)

Havia sobre superfícies lisas, porcentagem levemente maior de células Osteo-1 viáveis do que sobre superfícies SLA quimicamente ativadas (SLAactive), no entanto a diferença percentual não foi estatisticamente significativa. Do ponto de vista estatístico, a rhBMP-7 não interferiu na viabilidade celular após 24 horas do plaqueamento (Figuras 5.3 e 5.4). Entretanto, os grupos tratados com o fator de crescimento por 24 horas, mostraram uma tendência a ter maior porcentagem de células aderidas e maior número de células sobre as superfícies de Ti, lisa e SLAactive, comparadas ao controle (Figura 5.3 e 5.4).

Figura 5.4 - Efeito da topografia e da composição química da superfície dos discos de Ti na presença e na ausência de rhBMP-7, sobre a contagem de células Osteo-1 aderidas, em 24 horas. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em quadruplicata. A contagem celular não foi afetada pelo tratamento (gl=5; F=1,20; p=0,3485)

5.4 Medida do conteúdo de proteína total

A produção de PT pelas células Osteo-1 apresentou diferença estatística nos diferentes grupos experimentais. Todos os grupos apresentaram aumento do conteúdo de PT ao longo do período avaliado (Figura 5.5).

Figura 5.5 - Conteúdo de proteína total produzido pelas células Osteo-1, avaliado aos 7, 14 e 21 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em triplicata. O conteúdo de proteína total foi afetado pelos tratamentos ($gl=5,36$; $F=6,7986$; $p=0,0003$) e pelo período avaliado ($gl=2,36$; $F=226,6926$; $p=0,0000$) da seguinte maneira: C/SLA,21 dias> C/SLA, 14 dias> C/SLA,7dias; C/Liso,14 dias=C/Liso,21 dias> C/Liso,7 dias; C/SLAActive,14 dias=C/SLAActive,21 dias> C/SLAActive,7 dias. Letra diferente representa diferença estatística

O maior conteúdo de PT produzido pelas células Osteo-1 foi observado nas superfícies C/SLA aos 21 dias, quando comparada a todos os grupos deste período, adicionados ou não de rhBMP-7. O C/SLA mostrou um aumento significativo e tempo dependente do conteúdo de PT, dos 7 aos 21 dias.

Entretanto, todos os outros grupos (C/liso, C/SLActive, BMP-7/liso, BMP-7/SLA, BMP-7/SLActive) demonstraram aumento significativo do conteúdo de PT dos 7 aos 14 dias, porém, o mesmo não ficou demonstrado dos 14 aos 21 dias. A adição de rhBMP-7 ao meio de cultura não parece ter contribuído para o aumento do conteúdo de PT produzido pelas células Osteo-1.

5.5 Medida do conteúdo de colágeno

O conteúdo de colágeno mostrou um padrão semelhante para todos os grupos do estudo ao longo do tempo, não tendo sido demonstrada diferenças estatísticas entre as superfícies, ou pela adição de rhBMP-7. Nos períodos de 7, 14 e 21 dias, também, não observamos nenhum aumento significativo do conteúdo de colágeno entre os diferentes grupos (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Conteúdo de colágeno produzido pelas células Osteo-1, avaliado aos 7, 14 e 21 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em triplicata. O conteúdo de colágeno não foi afetado pelo tratamento (gl=5,36; F=0,7017; p=0,6279) e pelo período avaliado (gl=2,36; F=2,2659; p=0,1165). Conteúdo de colágeno, expresso como μg de colágeno/ml

GRUPOS	Tempo de cultivo		
	7 dias	14 dias	21 dias
C/Liso	1.27 (± 0.67)	4.87 (± 2.48)	1.95 (± 0.50)
BMP-7/Liso	1.87 (± 0.20)	1.35 (± 0.09)	2.12 (± 1.01)
C/SLA	1.60 (± 1.05)	1.82 (± 0.62)	2.52 (± 0.14)
BMP-7/SLA	0.63 (± 0.21)	2.36 (± 0.36)	2.23 (± 0.35)
C/SLAactive	0.94 (± 0.12)	2.27 (± 0.74)	1.79 (± 0.49)
BMP-7/SLAactive	2.21 (± 0.73)	1.63 (± 0.38)	1.54 (± 0.06)

5.6 Medida da atividade de fosfatase alcalina

Todos os grupos mostraram aumento significativo da atividade de ALPase dos 7 aos 21 dias, não havendo diferença estatística entre eles no último período. Aos 14 dias, porém, a adição da rhBMP-7 resultou em redução significativa da atividade de ALPase para os grupos BMP-7/SLA e BMP-7/SLActive quando comparados aos C/SLA e C/iso (Figura 5.6).

Figura 5.6 - Relação da Atividade de ALPase/ PT de células Osteo-1, avaliada aos 7, 14 e 21 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em quadruplicata. A relação atividade de ALPase/PT foi afetada pelo tratamento ($gl=5,54$; $F=11,02$; $p=0,0000$) da seguinte maneira: C/SLA > BMP-7/SLA = BMP-7/SLActive, aos 14 dias. A relação da atividade de ALPase/PT, também, foi afetada pelo período avaliado ($gl=2,54$; $F=131,69$; $p=0,0000$) da seguinte maneira: 21 > 14 > 7 dias. Letra diferente representa diferença estatística

5.7 Formação da matriz mineralizada

A análise das áreas dos discos coradas pelo Vermelho de Alizarina S mostrou que em todos os grupos experimentais houve formação de matriz mineralizada rica em cálcio, não tendo sido observadas diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 5.7). Assim, a adição de rhBMP-7 ao meio de cultura não resultou em aumento significativo do depósito de cálcio para nenhuma das superfícies testadas.

Figura 5.7 - Efeito da topografia da superfície na presença e na ausência de rhBMP-7, na formação de matriz mineralizada por células Osteo-1, em 21 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de um experimento realizado em quadruplicata. A formação de matriz mineralizada não foi afetada pelo tratamento (gl=5; F=0,9612; p=0,5319)

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da BMP-7 na adesão, proliferação e diferenciação de células Osteo-1, cultivadas sobre superfícies de titânio com composição química e rugosidades diferentes. Este estudo não foi capaz de demonstrar nenhum efeito aditivo da rhBMP-7 à adesão e proliferação celular, ou mesmo à diferenciação de células semelhantes a osteoblastos nas diferentes superfícies testadas. Todas as superfícies de titânio testadas permitiram a completa expressão do fenótipo de osteoblasto, inclusive com a formação de depósito de cálcio, pela célula Osteo-1.

Nossos resultados mostraram que, em relação à adesão e viabilidade celular, não houve diferenças estatísticas entre as superfícies usadas, adicionadas ou não de rhBMP-7. Os resultados referentes à comparação entre as superfícies apenas, estão de acordo com os trabalhos de Martin et al. (1995) que utilizaram as mesmas superfícies usadas neste trabalho. Ainda, concordam com outros trabalhos que testaram outras superfícies rugosas (XAVIER et al., 2003; ANSELME; BIGERELLE, 2006). Porém, estão em desacordo aos trabalhos de Keller et al. (2003) que observaram maior adesão e proliferação em superfícies rugosas e, Zhao et al. (2007) que mostraram maior adesão e proliferação de osteoblastos em superfícies de titânio lisas quando comparadas às superfícies SLA e SLActive. Apesar de não termos observado diferenças estatísticas, nossos resultados mostraram uma tendência de menor adesão e contagem de células nas superfícies SLA e SLActive, em linha com os achados de Boyan et al. (1998) e Zhao et al.

(2006, 2007) que demonstraram espalhamento do osteoblasto mais rápido sobre superfície lisa e baixa energia de superfície que sobre superfície rugosa e com alta energia de superfície. Os autores sugeriram que apesar da alta energia de superfície ser um fator importante, ela por si só parece ser insuficiente para melhorar a resposta do osteoblasto à superfície de titânio. Além disso, sugeriram que pode haver uma interferência entre topografia e energia de superfície.

Ainda, ao compararmos a análise de viabilidade celular e de contagem das células, em 24h, observa-se que, embora de modo não significativo, células Osteo-1 cultivadas sobre superfície lisa e em meio contendo rhBMP-7 apresentaram porcentagem de células viáveis, levemente inferior, porém, com uma tendência de maior número de células comparadas ao seu controle sem BMP-7. Nossos resultados parecem sugerir que a associação da superfície lisa com a BMP-7 pareceu favorecer a proliferação de novas células. O fato de não termos observado efeitos adicionais da rhBMP-7 pode ser justificado pelo uso das células Osteo-1, osteoblastos maduros, utilizadas neste experimento. Asahina et al. (1993) mostraram que não houve diferença significativa na proliferação das células de rato tratadas com BMP-7 e o controle. Os autores sugeriram que a BMP-7 estimularia a síntese de DNA em células progenitoras não diferenciadas, mas é um mitógeno mais fraco para células diferenciadas. Por outro lado, Sampath et al. (1992) e Granjeiro et al. (2005) mostraram que a rhBMP-7 estimularia a proliferação de pré-osteoblastos e osteoblastos maduros em cultura.

Todos os grupos apresentaram aumento do conteúdo de PT ao longo do período avaliado. O maior conteúdo de PT produzido pelas células Osteo-1 foi observado nas superfícies C/SLA aos 21 dias, quando comparada a todos os grupos

deste período, adicionados ou não de rhBMP-7. O C/SLA mostrou um aumento significativo e tempo dependente do conteúdo de PT, dos 7 aos 21 dias. Assim, a melhor performance nesta análise foi obtida pela superfície SLA sem adição de rhBMP-7. Os trabalhos de Zinger et al. (2005) e Zhao et al. (2006) mostraram que a superioridade da superfície SLA se deve a sua texturização e ao R_a igual a 3,97 ($\pm 0.04\mu\text{m}$). Apesar de Bachle e Kohal (2004) utilizarem células e superfícies diferentes das nossas, os autores concluíram na revisão sistemática que um R_a , em torno de $4\mu\text{m}$, apresentou melhor resposta dos osteoblastos.

O mesmo comportamento não foi observado nas células cultivadas sobre a superfície SLAactive, pois pode ter ocorrido uma interferência entre topografia e energia de superfície, conforme sugeriram Zhao et al. (2007). Os nossos resultados também, mostraram que a energia de superfície não foi suficiente para acentuar a proliferação e a atividade de ALPase das células Osteo-1 à superfície de Ti.

Todos os outros grupos (C/liso, C/SLActive, BMP-7/liso, BMP-7/SLA, BMP-7/SLActive), exceto a superfície SLA, demonstraram aumento significativo do conteúdo de PT dos 7 aos 14 dias, porém, o mesmo não ficou demonstrado dos 14 aos 21 dias. A adição de rhBMP-7 ao meio de cultura não parece ter contribuído para o aumento do conteúdo de PT produzido pelas células Osteo-1.

Os dados acima, referentes à PT, representam um parâmetro complementar à produção de ALPase que ocorre, principalmente, aos 14 e 21 dias (BECK JR., 2003; GLIMCHER, 1989), uma vez que a formação óssea requer altos níveis de biosíntese de proteína para produzir uma matriz protéica para mineralização. Os nossos resultados mostraram que as células de todos os grupos parecem ter

atingido o nível adequado de conteúdo de PT para o início do processo de diferenciação celular aos 14 dias.

O conteúdo de colágeno mostrou um padrão semelhante para todos os grupos do estudo ao longo do tempo, não tendo sido demonstrada diferenças estatísticas entre as superfícies ou pela adição de rhBMP-7. Nos períodos de 7, 14 e 21 dias, também, não observamos nenhum aumento significativo do conteúdo de colágeno entre os diferentes grupos (Tabela 5.1). Isto pode indicar que a matriz colágena já estava preparada após 7 dias, o que está em acordo com Cooper et al. (2006) e Martinovic et al. (2006).

Todos os grupos mostraram aumento significativo da atividade de ALPase dos 7 aos 21 dias, não havendo diferença estatística entre eles no último período. Aos 14 dias, porém, a adição da rhBMP-7 resultou em redução significativa da atividade de ALPase para os grupos BMP-7/SLA e BMP-7/SLActive quando comparados aos C/SLA e C/liso (Figura 5.6).

Ao avaliar a atividade da ALPase dos grupos liso, SLA e SLActive, o tratamento de superfície não afetou os níveis de ALPase em cada um dos períodos isoladamente. Apesar da superfície, SLAActive, apresentar-se, quimicamente modificada e hidrofílica, os níveis de ALPase foram levemente menores para esta superfície. Isto significa que o aumento na energia de superfície não teve efeito sobre a atividade de ALPase. Da mesma maneira, Zhao et al. (2007) mostraram menor atividade de ALPase da superfície SLAActive quando comparada à lisa, o que indicaria a presença de osteoblasto secretor maduro. De acordo com esses autores, a alta energia da superfície SLAActive não teve efeito sobre a atividade de ALPase, porém aumentou a produção de osteocalcina.

Nossos resultados parecem sugerir que foram atingidos os níveis mais altos de atividade de ALPase, aos 14 dias, para os grupos: C/liso, C/SLA, C/SLActive, BMP-7/liso, mas a adição de rhBMP-7 às superfícies SLA e SLActive parece ter retardado o alcance desses resultados.

Mesmo diante disto, os grupos: BMP-7/liso, BMP-7/SLA e BMP-7/SLActive apresentaram níveis maiores aos 21 dias quando comparados aos 14 dias. Como visto na literatura (ASAHINA et al., 1993; GRANJEIRO et al., 2005), a BMP-7 foi capaz de induzir a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos por estimular a atividade de ALPase e, conforme relatado por Malaval et al. (1994), o processo de diferenciação, referente à atividade de ALPase e formação de nódulos mineralizados, ocorre após 14 dias de cultivo celular

Os discos com diferentes superfícies e composição química SLActive associados ou não com 20ng/ml de rhBMP-7 demonstraram formação de nódulos calcificados. Isso indica que houve diferenciação celular e deposição de matriz seguida de mineralização em todos os grupos, independente de característica de superfície ou da adição de BMP-7 ao meio. Assim, como no nosso experimento, Advincula et al. (2006), ao utilizar uma superfície hidrofílica, observaram que as células subcultivadas de MC3T3-E1 promoveram a mineralização da matriz.

O efeito da rhBMP-7 não interferiu para amplificar a diferenciação, e a resultante mineralização, promovida pelas células Osteo-1 sobre as superfícies rugosa SLA e química SLActive. Os resultados mostraram que a concentração utilizada de 20ng/ml de rhBMP-7 associada aos discos de Ti não acentuou a atividade de ALPase e a formação de nódulos calcificados. Martinovic et al. (2006),

também, observaram que a BMP-7 não afetou a atividade de ALPase durante o estágio da diferenciação celular.

Embora não haja ainda resposta para este fato, podemos hipotetizar que a presença de BMP-7 no meio de cultura não potencializou a resposta celular sobre as superfícies rugosas e a quimicamente modificada, pois os mecanismos moleculares, e a sinalização dos mediadores e receptores, envolvidos na diferenciação de osteoblastos sobre superfícies rugosas podem não ter interagido ou ter concorrido com os da BMP. Apesar de Eichner et al. (2002) não terem associado a BMP-7 com a topografia de superfície, os autores observaram que não houve sinergismo na combinação da BMP-7 com a 1,25(OH)₂-vitamina D₃ e, nesta situação, a expressão da ALPase foi inibida pela BMP-7. Da mesma forma, o trabalho de Chaudhary, Hofmeister e Hruska (2004) ao examinarem a interação do FGF-2 e a BMP-7 sobre a atividade de ALPase e mineralização da matriz, observaram que FGF-2 inibiu a diferenciação de osteoblastos estimulados pela BMP-7.

A hipótese acima é válida, uma vez que, há evidência de que a resposta mediada pela rugosidade de superfície (LOHMANN et al., 1999) e pelas BMPs (CANALIS; ECONOMIDES; GAZZERRO, 2003), envolve a interação de receptores de membrana plasmática e a adsorção de proteínas da matriz extracelular durante o desenvolvimento do tecido ósseo. A BMP, como uma molécula de sinalização da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGFβ), se liga a um receptor específico tipo II presente na membrana celular e recruta um receptor tipo I, formando um complexo. Estes receptores são proteínas serina/treonina kinase transmembrana que se autofosforilam após a formação do complexo receptor I -

receptor II da BMP e adquire a capacidade de fosforilar proteínas Smad, uma família de tradutores de TGF β .

Assim, a hipótese também pode ser suportada pelas descobertas de Zhao et al. (2007) ao relatarem níveis mais altos de fatores de crescimento TGF β no meio condicionado de células cultivadas sobre superfícies SLA e SLAactive. E, ainda, pelo estudo de Martinovic et al. (2006) que demonstrou a possibilidade de substituição funcional de uma BMP por outra de uma maneira autócrina/parácrina e a mediação de uma resposta a uma ação endócrina sobre osteoblastos.

Por outro lado, podemos desenvolver um raciocínio diferente no aspecto de diferenciação celular. O fato de o grupo BMP-7/SLAactive não mostrar diferença estatística entre 7 e 14 dias pode indicar que já aos 7 dias foi atingido um patamar de produção de ALPase, que favoreceria a possível formação de matriz mineralizada, significando uma diferenciação celular mais precoce do que a observada nos outros grupos. Os nossos resultados para proteína total (BMP-7/SLAactive) corroboram essa linha de raciocínio.

Novos estudos, avaliando outros marcadores de formação óssea, como osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina e formação de nódulos mais precocemente, por volta de 10 a 12 dias, ajudariam a esclarecer essa hipótese. No caso dessa última hipótese se confirmar, o grupo BMP-7/SLAactive teria demonstrado o melhor comportamento, favorecendo a diferenciação celular mais precocemente que os outros grupos.

7 CONCLUSÕES

A adição de rhBMP-7 ao meio de cultura não promoveu qualquer efeito potencializador da adesão e proliferação celular ou mesmo da diferenciação de células semelhantes a osteoblastos nas diferentes superfícies testadas. Todas as superfícies de titânio testadas permitiram a completa expressão do fenótipo de osteoblasto, inclusive com a formação de nódulos calcificados, pela célula Osteo-1.

REFERÊNCIAS ¹

Açil Y, Springer ING, Broek V, Terheyden H, Jepsen S. Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials. *J Cell Biochem* 2002;86:90-8.

Advincula MC, Rahemtulla FG, Advincula RC, Ada ET, Lemons JE, Bellis SL. Osteoblast adhesion and matrix mineralization on sol-gel-derived titanium oxide. *Biomaterials* 2006;27:2201-12.

Amarante ES, Lima LA. Optimization of implant surfaces: titanium plasma spray and acid-etched sandblasting – current state. *Pesqui Odontol Bras* 2001;15(2):166-73.

Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000;21:667-81.

Anselme K, Linez P, Bigerelle M, Le Maguer D, Le Maguer A, Hardouin P, et al. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behavior. *Biomaterials* 2000;21:1567-77.

Anselme K, Bigerelle 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.

Aono A, Hazama M, Notoya K, Taketomi S, Yamasaki H, Tsukuda R, et al. Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;210(3):670-7.

Asahina I, Sampath TK, Nishimura I, Hauschka PV. Human osteogenic protein-1 induces both chondroblastic and osteoblastic differentiation of osteoprogenitor cells derived from newborn rat calvaria. *J Cell Biol* 1993;123(4):921-33.

Asahina I, Sampath TK, Hauschka PV. Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Expl Cell Res* 1996; 222:38-47.

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

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.

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.

Beck Jr. GR. Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 2003;90:234-43.

Beloti MM, Bellesini LS, Rosa AL. The effect of purmorphamine on osteoblast phenotype expression of human bone marrow mesenchymal cells cultured on titanium. *Biomaterials* 2005;26(20):4245-8.

Bibby JK, Bubb NL, Wood DJ, Mummery PM. Fluorapatite-mullite glass sputter coated Ti6Al4V for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16:379-85.

Binon PP. Implants and components: entering the new millennium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15(1):76-94.

Borsari V, Giavaresi G, Fini M, Torricelli P, Tschon M, Chiesa R, et al. Comparative in vitro study on a ultra-high roughness and dense titanium coating. *Biomaterials* 2005;26:4948-55.

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;39:77-85.

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;71:519-29.

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

Brunette DM. The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988;3(4):231-46.

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.

Cai K, Rechtenbach A, Hao J, Bossert J, Jandt KD. Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: characterization and cell behaviour aspects. *Biomaterials* 2005;26:5960-71.

Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003;24(2):218-35.

Chaudhary LR, Hofmeister AM, Hruska KA. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone* 2004;34:402-11.

Chen TL, Shen W-J, Kraemer F B. Human BMP-7/OP-1 induces the growth and differentiation of adipocytes and osteoblasts in bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Biochem* 2001;82:187-99.

Cooper LF, Zhou Y, Takebe J, Guo J, Abron A, Holmén A, et al. Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. *Biomaterials* 2006;27:926-36.

Deboni MCZ, Jaeger MMM, de Araújo NS. Development and characterization of osteoblast-like cell line. *Revista da Pós-Graduação* 1996;3(3):220-9.

Dee KC, Rueger DC, Andersen TT, Bizios R. Conditions which promote mineralization at the bone-implant interface: a model in vitro study. *Biomaterials* 1996; 17:209-15.

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.

Diniz MG, Soares GA, Coelho MJ, Fernandes MH. Surface topography modulates the osteogenesis in human bone marrow cell cultured grown on titanium samples prepared by a combination of mechanical and acid treatments. *J Mater Sci Mater Med* 2002;13:421-32.

Eichner A, Brock J, Heldin C-H, Souchelnytskyi S. Bone morphogenetic protein-7 (OP-1) and transforming growth factor- β 1 modulate 1,25 (OH) $_2$ – vitamin D $_3$ -induced differentiation of human osteoblasts. *Exp Cell Res* 2002;227:132-42.

Freshney RI. *Culture of Animal Cells*, 4th ed. New York: Wiley-Liss; 2000:577

Glimcher MJ. Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *The Anatomical Record* 1989;224:139-53.

Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC, Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res* 2005;38(10):1463-73.

Guéhenne L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007;23:844-54.

Hardy T, Benghuzzi H, Russel G, Cameron J, Tucci M. The effects of desmineralized bone matrix proteins and osteogenic protein-1 on bone cells isolated in culture. *Biomed Sci Instrum* 2006;42:66-71.

Irie A, Habuchi H, Kimata K, Sanai Y. Heparan sulfate is required for bone morphogenetic protein-7 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:858-65.

Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. *J Prosthet Dent* 1983;49(6):832-7.

Kasemo B, Lausmaa J. Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988;3:247-59.

Kawahara H, Soeda Y, Niwa K, Takahashi M, Kawahara D, Araki N. In vitro study on bone formation and surface topography from the standpoint of biomechanics. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:1297-307.

Keller JC, Schneider GB, Stanford CM, Kellogg B. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant Dent* 2003;12:175-81.

Kilpadi DV, Raikar GN, Liu J, Lemons JE, Vohra Y, Gregory JC. Effect of surface treatment on unalloyed titanium implants: spectroscopic analyses. *J Biomed Mater Res* 1998;40(4):646-59.

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 Rehabil* 2006;33:368-79.

Knutsen R, Wergedal JE, Sampath TK, Baylink DJ, Mohan S. Osteogenic protein-1 stimulates proliferation and differentiation of human bone cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194(3):1352-58.

Lavos-Valereto I.de C, 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.

Lee DH, Suh H, Han D-W, Park BJ, Lee JW, Park J-C. The effects of recombinant human BMP-7, prepared from a COS-7 expression system, on the proliferation and differentiation of rat newborn calvarial osteoblasts. *Yonsei Med J* 2003; 44(4):593-601.

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;19:2219-32.

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;47:139-51.

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

Malaval L, Modrawski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 1994;158(3):555-72.

Martin JY, Shwartz 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.

Martinovic S, Borovecki F, Miljavac V, Kisic V, Maticic D, Francetic I, et al. Requirement of a bone morphogenetic protein for the maintenance and stimulation of osteoblast differentiation. *Arch Histol Cytol* 2006;69(1):23-36.

Morra M. Biochemical modification of titanium surfaces: peptides and ECM proteins. *Eur Cell Mater* 2006;12:1-15.

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

Orsini G, Assenza B, Scarano A, Piattelli M, Piattelli A. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15(6):779-84.

Parsegian VA. Molecular forces governing tight contact between cellular surfaces and substrates. *J Prost Dent* 1983;49(6):838-42.

Placko HE, Mishra S, Weimer JJ, Lucas LC. Surface characterization of titanium-based implant materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15(3):355-63.

Ratner BD, Johnston AB, Lenk TJ. Biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res* 1987;21(A1):59-90

Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem* 1996;29(3):225-9.

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

Saldanã L, Vilaboa N, Vallés G, González-Cabrero J, Munuera L. Osteoblast response to thermally oxidized Ti6Al4V alloy. *J Biomed Mater Res* 2005;73A:97-107.

Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and

stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. J Biol Chem 1992;267(28):20352-62.

Schwartz Fo HO, Novaes Jr AB, Castro LMS, Rosa AL, Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. Clin Oral Impl Res 2007;18:333-44

Smith DC, Pilliar RM, Metson JB, McIntyre NS. Dental implant materials: II preparative procedures and surface spectroscopic studies. J Biomed Mater Res 1991;25:1069-84

Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs and surface topographies: their effect on osseointegration – a literature review. Int J Oral Maxillofac Implants 2000;15(5):675-90.

Togashi AY, Magini RS, Boehs L. Torneamento cilíndrico: método de obtenção de rugosidade de superfície de implantes. Health and Environment Journal 2003;4(1):25-30.

Togashi AY, Cirano FR, Lima LAPA. The role of implant surface chemistry in the biological bone response. Revista da Pós-Graduação 2006;13(4):336-40.

Togashi AY, Cirano FR, Marques MM, Pustiglioni FE, Lima LAPA. Characterization of bone cells obtained from the calvária of neonatal rats (osteo-1) after serial subculture. Journal of Applied Oral Science (artigo aceito).

Xavier SP, Carvalho PS, 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.

Wennerberg A, Albrektsson T, Lausmaa J. Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25- and 75-µm-sized particles of Al₂O₃. J Biomed Mater Res 1996;30(2):252-60.

Wennerberg A, Albrektsson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. Int Oral Maxillofac Implants 2000;15:331-44.

Wieland M, Textor M, Spencer ND, Brunette DM. Wavelength-dependent roughness: a quantitative approach to characterizing the topography of rough titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16(2):163-81.

Yeh LC, Tsai AD, Lee JC. Osteogenic protein-1 (OP-1, BMP-7) induces osteoblastic cell differentiation of the pluripotent mesenchymal cell line C2C12. *J Cell Biochem* 2002; 87(3):292-304

Yeh L-CC, Tsai AD, Zavala MC, Lee JC. Cartilage-derived morphogenetic proteins enhance the osteogenic protein-1-induced osteoblastic cell differentiation of C2C12 cells. *J Cell Physiol* 2004;201:401-8.

Yeh, L-C C, Zavala MC, Lee JC. Osteogenic protein-1 and interleukin-6 with its soluble receptor synergistically stimulate rat osteoblastic cell differentiation. *J Cell Physiol* 2002; 190:322-31

Yeh L-CC, Zavala MC, Lee JC. C-type natriuretic peptide enhances osteogenic protein-1-induced osteoblastic cell differentiation via Smad5 phosphorylation. *J Cell Biochem* 2006;97:494-500.

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, Zinger O, Schwartz Z, Wieland M, Landolt D, Boyan BD. Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure. *Clin Oral Impl Res* 2006;17(3):258-64.

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;28:2821-9.

Zinger O, Anselme K, Denzer A, Habersetzer P, Wieland M, Jeanfils J, et al. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials* 2004;25:2695-711.

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

ANEXO A – Parecer da Comissão de Bioética de Animais da FOU SP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PROTOCOLO nº 04/04**
PARECER nº 04/04

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa ***“Influência da proteína morfogenética óssea recombinante-7 (rhBMP-7) na adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos cultivados sobre superfícies de titânio com diferentes rugosidades”***, de responsabilidade da pesquisadora **Adriane Yaeko Togashi**, sob orientação do Professor Doutor **Luiz Antonio Pugliese Alves de Lima**.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01(um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em “cd” ou “disquete” ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 10 de março de 2004

Prof. Dr. **CELSO LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP