**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM PERIODONTIA**

**Funcionalização de microtopografia de titânio com
peptídeo sintético de colágeno I (P-15): efeitos sobre
o desenvolvimento do fenótipo osteogênico *in vitro***

Karina Kimiko Yamashina Pereira

Ribeirão Preto

2010

Karina Kimiko Yamashina Pereira

**Funcionalização de microtopografia de titânio com
peptídeo sintético de colágeno I (P-15): efeitos sobre
diferentes aspectos do desenvolvimento do fenótipo
osteogênico *in vitro***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto – USP,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Periodontia.

Orientador: Paulo Tambasco de Oliveira

Ribeirão Preto

2010

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Karina Kimiko Yamashina

Funcionalização de microtopografia de titânio com peptídeo sintético de colágeno I (P-15): efeitos sobre o desenvolvimento do fenótipo osteogênico *in vitro*. Ribeirão Preto, 2010.

82p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Periodontia.

Orientador: De Oliveira, Paulo Tambasco

1. Titânio.
2. Topografia.
3. Funcionalização.
4. Peptídeo sintético.
5. Diferenciação osteoblástica.

Trabalho realizado no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Karina Kimiko Yamashina Pereira

Funcionalização de microtopografia de titânio com peptídeo sintético de colágeno I (P-15): efeitos sobre o desenvolvimento do fenótipo osteogênico *in vitro*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Periodontia

Aprovado em: ____ / ____ / 2010

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos Alberto e Yukiko, por tudo que fizeram por mim, pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões. Foi por vocês que eu cheguei até aqui, e é por vocês que eu vou adiante. Amo vocês!

Ao meu irmão, Carlos Eduardo, pelo apoio, incentivo e carinho em todos os momentos da minha vida. Amo você!

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por me dar uma família maravilhosa, pela minha saúde, pela certeza do conforto nos momentos difíceis e por sempre colocar pessoas iluminadas na minha vida.

À Universidade de São Paulo, representada pelo reitor Prof. Dr. JOÃO GRANDINO RODAS.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, representada pelo diretor Prof. Dr. OSVALDO LUIZ BEZZON.

Ao Chefe do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, Prof. Dr. SÉRGIO LUIS SCOMBATTI DE SOUZA.

À Comissão de Pós-graduação da FORP-USP, representada pela Profa. Dra. LÉA ASSED BEZERRA DA SILVA.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação em Periodontia, Prof. Dr. ARTHUR BELÉM NOVAES JÚNIOR.

Ao meu orientador, Prof. Dr. PAULO TAMBASCO DE OLIVEIRA, pela orientação, pela confiança, pela paciência, pela amizade e pela grande oportunidade de aprendizado que me proporcionou. O senhor é um exemplo de inteligência, responsabilidade e honestidade. Um grande pesquisador, cientista e mestre. Terá sempre a minha admiração e respeito.

Aos docentes do curso de Mestrado em Periodontia da Faculdade de Odontologia – USP, Prof. Dr. ARTHUR BELÉM NOVAES JÚNIOR, Prof. Dr. MÁRCIO FERNANDO DE MORAES GRISI, Prof. Dr. SÉRGIO LUIS SCOMBATTI DE SOUZA, Prof. Dr. MÁRIO TABA JÚNIOR e Prof. Dra. DANIELA BAZAN PALIOTO, pelas oportunidades de trabalho oferecidas, pelo conhecimento transmitido e pela agradável convivência.

Especialmente ao Prof. Dr. MÁRIO TABA JR. Gostaria de agradecê-lo por ter aberto as portas da FORP que tornaram possível cursar o Mestrado em Periodontia. Pela confiança em mim depositada e pelas oportunidades que me foram oferecidas durante este período. Foi uma honra e um privilégio ter sido sua orientada e aluna.

Aos professores da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo Facial, pela convivência agradável, em especial ao Prof. Dr. ADALBERTO LUIZ ROSA pela oportunidade de conviver e dividir conhecimentos e experiências.

Aos amigos dos cursos de mestrado, mestrado antigo, doutorado e pós-doutorado, PATRÍCIA GARANI, DANILO, DANIA, ANNELISSA, GERMANA, PRISCILA NÓBREGA, ADRIANA, FLÁVIA, PRISCILA PAGANINI, PATRÍCIA FREITAS, RAQUEL, RAFAEL, GUILHERME e ANDRÉA pelo carinho, convívio harmonioso, conhecimento compartilhado e amizade.

À amiga e eterna dupla, INGRID, por todos os momentos que juntas passamos. Nos encontrarmos e, em busca de um mesmo sonho, construímos uma relação de amizade. Agradeço por todo apoio, amparo e incentivo. Agradeço, também, por ter colocado dois anjos chamados tia Lana e a tia Fausta na minha vida, que sempre me acolheram com muito carinho e me confortaram nos momentos difíceis longe de casa. Vou sentir saudades...

À querida amiga LUCIANA pelo carinho e cumplicidade durante esses anos de convivência. Compartilhamos de todos os sucessos e agonias de se trabalhar com cultura de células. Companheira de todas as horas e para todos os programas. Sempre com um sorriso no rosto, cantarolando uma música e trazendo alegria para dentro de casa. Saiba que tenho uma grande admiração por você. Vou sentir muita saudade.

Ao meu querido amigo MARCELO pela amizade constante e leal. Pelos momentos compartilhados e por cada situação que vivemos e que sempre lembrarei com muito carinho. Te acompanharei, à distância e sempre terá minha admiração.

Aos meus amigos da Cirurgia e Traumatologia-Buco-Maxilo-Facial: GUSTAVO, MICHEL, PATRICIO ROGÉRIO e RENAN. Compartilhamos conhecimento, experiências e muitos momentos de alegria. Sempre terão meu carinho e amizade. Torço por vocês.

Às queridas amigas VIVIANE KAWATA, GLAUCE TREVISAN, CAROL MARTINS, CAROL DELMONDES, RENATA e JANINE, pelas horas de alegria compartilhadas e por todo o companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Células LARISSA SVERZUT, LUCIANA “PUGI”, RAYANA, MAIDY, GLAUCE, WILL, KAREN E GABRIELA, por todos os momentos que tornaram os dias de trabalho mais agradáveis.

Aos queridos amigos LARISSA DE CASTRO e LUCAS NOVAES. Gostaria de exprimir em palavras todo sentimento de gratidão que tenho por vocês. Vocês são parte do laboratório e componentes importantes para realização de todo nosso trabalho. Sou imensamente grata por toda generosidade, carinho e atenção que sempre me dispensaram.

Ao querido amigo ROGER, por todo conhecimento compartilhado, atenção e carinho. Agradeço por sempre ter tido paciência e generosidade de me ensinar e ajudar a desenvolver o nosso trabalho. Mesmo nos momentos difíceis era muito bom saber que sempre podia confiar na sua ajuda. Sempre terá minha amizade e admiração. Obrigado por tudo!

À querida amiga OLÍVIA, por toda sua contribuição ao desenvolvimento do nosso trabalho, pela amizade, apoio e momentos de alegria compartilhados.

À FABÍOLA SINGARETTI DE OLIVEIRA, pela orientação e ajuda indispensáveis na realização dos experimentos no laboratório de biologia molecular.

Aos professores dos cursos de especialização em Periodontia (PROFIS), especialmente SEBASTIÃO GREGUI, DANIEL RESENDE, pelo estímulo e por tudo que me ensinaram.

Aos amigos da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, especialmente IVANIA KOMATSU ARRUDA, pela amizade e todos os ensinamentos que me fizeram crescer como pessoa e como profissional.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da UFPA, pelo carinho e por me servirem de exemplo como pessoas e como profissionais.

Aos meus amigos de colégio, graduação e especialização, por serem pessoas indispensáveis em minha vida, pelos muitos momentos de que me recordo com saudades, em especial NATÁLIA, ARMANDO KAIEDA, KAREN, CIBELLE, PATRICIA, DEISI, TAMARA e THAIS CUNHA, ARMANDO RODRIGUES, GRAZIELA, FERNANDO, MAYRA, BELLA E PAULO.

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da FORP-USP, APARECIDA DULCE NEGRETTI e TATIANA FERNANDES, meus sinceros agradecimentos, pela disposição, atenção e amizade.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, especialmente SUELI, ZILDA, MARIA DIVINA, ARACY, GALVÃO, CHINA, ISABEL E REGIANE, por tudo que fizeram, sempre com disposição, pra me ajudar nessa jornada.

Aos queridos amigos e alunos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, em especial CARLOS MELONI, FERNANDA PIRAS, NATHALIA CAMPOS e KLEBER SUZUKI. Através do PAE vocês começaram como alunos, orientados e se tornaram pessoas importantes na minha formação, permitindo consolidar minha realização como profissional e decisão quanto à prática da docência. Sempre serei grata por todo apoio, incentivo e confiança.

A todos os PACIENTES, por sua paciência, confiança e disponibilidade.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO, pelo auxílio financeiro à minha pesquisa, e à COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR, pela bolsa de mestrado concedida.

À DENTSPLY FRIADENT, pelo fornecimento dos discos de titânio, possibilitando a realização deste trabalho científico.

A toda minha família, pelo amor e presença constante em minha vida.

Já passei por muitos momentos de decisão, muitos momentos de mudança. Mas tenho muita sorte por sempre ter encontrado pessoas boas e generosas no meu caminho. Agradeço sinceramente a cada um de vocês, que de certa forma me ajudaram, apoiaram, aconselharam, orientaram e torceram por mim, contribuindo para minha formação e realização deste trabalho. Sem vocês, nada seria possível. Obrigado por tudo!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ti: titânio

µm: micrometro

nm: nanometro

DPS: *deep profile surface*

SLA: *sandblasted and acid-etched*

modSLA: SLA modificada

Arg-Gly-Asp/RGD: sequência/domínios Arginina-Glicina-Aspartato

P-15: peptídeo sintético, análogo a uma sequência de amino-ácidos da cadeia $\alpha 1$ do colágeno I

Plus+HA: Plus com recobrimento de hidroxiapatita

P-15 low: baixa concentração de P-15

P-15 high: alta concentração de P-15

Real-time PCR: reação em cadeia de polimerase em tempo real

ALP: fosfatase alcalina

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MTT: {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}

OPN: osteopontina

BSP: sialoproteína óssea

RUNX2: fator de transcrição relacionado ao *runt* tipo 2

ARS: vermelho de Alizarina

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

mm: milímetro

HA: hidroxiapatita

kV: kilovolts

°C: grau Celsius

CEUA: comissão de ética no uso de animais

α -MEM: meio essencial mínimo, modificação α

mM: milimolar

μ g/mL: micrograma/mililitro

CO₂: gás carbônico

MC3T3-E1: linhagem osteoblástica de camundongos

DAPI: *4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride*

DNA: ácido desoxirribonucleico

h: hora

M: molar

mg/mL: miligrama/mililitro

PBS: solução tampão salina de fosfato (*Phosphate buffered saline*)

mL: mililitro

μ L: microlitro

HCl: ácido clorídrico

min: minuto

Ki-67: antígeno nuclear

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

PB: solução tampão fosfato (*Phosphate buffered*)

TA: temperatura ambiente

nM: nanomolar

GAPDH: D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

µg: micrograma

DEPC: água Milli-Q tratada com dietilpirocarbonato

ng: nanograma

Ct: ciclo limiar (*cycle threshold*)

Na₂CO₃: carbonato de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

µM: micromolar

IP: iodeto de propídeo

s: segundos

g: unidade de aceleração, aproximadamente igual a 9,8 m/s²

NH₄OH: hidróxido de amônio

H₂SO₄: ácido sulfúrico

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

Diferentes aspectos das interações de células e tecidos biológicos com os biomateriais são determinados, em parte, pelas características físicas e químicas da superfície do material (BRUNSKI et al., 2000). Assim, as estratégias para o desenvolvimento de novos biomateriais e/ou superfícies incluem modificações de sua composição química, energia de superfície e topografia, com o objetivo de promover os eventos biológicos que ocorrem na região interfacial durante o processo de reparo tecidual (KIESWETTER et al., 1996; BRUNSKI et al., 2000).

Em relação à criação de novas topografias para biomateriais metálicos, a década passada caracterizou-se pelo desenvolvimento e comercialização de superfícies de titânio (Ti) e liga de Ti com diferentes microtopografias. Apesar de os estudos *in vitro* e em modelos animais terem eventualmente apresentado resultados biológicos controversos, admite-se hoje que implantes dentais e ortopédicos com superfícies estruturadas na microescala (1-10 μm) favoreçam a osseointegração por meio de alguns fatores, entre os quais: 1) formação de coágulo de fibrina e ativação de plaquetas mais precocemente (DAVIES, 1998; PARK; DAVIES, 2000; PARK et al., 2001; DI IORIO et al., 2005), 2) microambiente tridimensional adequado à formação óssea (MATSUZAKA et al., 2003), 3) aumento da síntese e secreção de fatores de crescimento com efeitos sobre o tecido ósseo (BOYAN et al., 2003) e 4) redução da atividade osteoclástica controlada por fatores secretados por osteoblastos (LOSSDORFER et al., 2004). Estudos mais recentes revelam que associações de micro e submicrotopografias (entre 100-150 nm e menores do que 1 μm ; ROSEI, 2004) promovem efeitos de sinergismo nas respostas teciduais,

resultando em aumento da proliferação celular (ZINGER et al., 2004; TAN; SALTZMAN, 2004), de atividades celulares (TAN; SALTZMAN, 2004) e da formação de nódulos de matriz mineralizada *in vitro* (WIELAND et al., 2005). Estudo *in vitro* realizado em nosso laboratório mostrou que superfícies de Ti com meso/microtopografias e submicrotopografia adicional (Plus, DENTSPLY Friadent, Mannheim, Alemanha), altamente hidrofóbicas, favorecem o desenvolvimento mais precoce de formações de matriz calcificada, o que foi observado apenas ocasionalmente sobre superfícies com mesotopografia (20-200 µm, *Deep Profile Surface*, DPS) e ausente sobre superfícies usinadas. No entanto, a superfície Plus não permitiu o desenvolvimento de áreas mais extensas de matriz mineralizada se comparada à DPS (SCHWARTZ FO et al., 2007). Apesar de a estratégia de associar topografias de diferentes escalas poder ocasionar efeitos biológicos favoráveis, novas pesquisas visam ao seu aperfeiçoamento. Por exemplo, a aceleração no processo de osseointegração que ocorre com a superfície de Ti *SLAactive* (originalmente *modSLA*; Straumann Holding AG, Basel, Suíça) é atribuída à modificação química de sua microtopografia, alterando-a de hidrofóbica para altamente hidrofílica (BUSER et al., 2004; ZHAO et al., 2005; RUPP et al., 2006). Alterações na composição química da superfície Plus poderiam trazer benefícios à sua utilização em situações clínicas desfavoráveis, no sentido de não só acelerar o processo osteogênico, como também aumentar sua quantidade/extensão. Atualmente, implantes com superfície Plus, disponíveis comercialmente, parecem favorecer a ocorrência do processo de osteogênese de contato (discutido em SCHWARTZ FO et al., 2007).

As superfícies de biomateriais podem ser também modificadas por métodos bioquímicos, visando à disponibilização de proteínas, enzimas ou peptídeos

bioativos para a indução de respostas celulares e teciduais específicas na região interfacial. Na área de desenvolvimento de novas superfícies metálicas para implantação no osso, observa-se crescente interesse na funcionalização de superfícies com peptídeos/proteínas que apresentam efeitos conhecidos nas diferentes fases do processo de formação óssea (PULEO; NANCI, 1999; MORRA, 2006; BEUTNER et al., 2010). Como os fenômenos que ocorrem na interface osso-implante apresentam diversas semelhanças com aqueles de interfaces ósseas naturais e de sítios de reparo de tecidos mineralizados (osso, dentina e cimento), moléculas envolvidas nesses processos seriam também potencialmente capazes de influenciar a integração de biomateriais (NANCI et al., 1998).

Os efeitos biológicos que superfícies exercem sobre células a elas aderidas são principalmente mediados por integrinas que se ligam a seqüências/domínios Arginina-Glicina-Aspartato (Arg-Gly-Asp ou RGD) de proteínas com funções no processo de adesão celular (TOSATTI et al., 2004). Por essa razão, desenvolveram-se inicialmente superfícies de Ti modificadas com peptídeos e/ou proteínas com domínios RGD, visando a favorecer os mecanismos de adesão e sinalização celular via transdução de sinais, que mostraram efeitos favoráveis para a diferenciação de osteoblastos (XIAO et al., 1997; XIAO et al., 1998; HEALY; REZANIA, 1999; REZANIA et al., 1999; SCHLIEPHAKE et al., 2002; TOSATTI et al., 2004; AUERNHEIMER et al., 2005; ELMENGAARD et al., 2005; GARCIA; REYES, 2005; SCHLIEPHAKE et al., 2005; SENYAH et al., 2005). No entanto, fatores críticos parecem limitar sua aplicação em sítios de reparo ósseo. Um deles refere-se à atividade biológica de oligopeptídeos (seqüências de 2 a 10 aminoácidos), a qual é significativamente menor se comparada à da proteína completa. Além disso, para sua diferenciação, células osteogênicas também requerem sinalizações a partir de

ligações de integrinas a seqüências não-RGD, como a GFOGER (revisado por GARCIA; REYES, 2005).

Como o principal constituinte da matriz orgânica do tecido ósseo é o colágeno I (aproximadamente 90% de sua composição) e em razão de substratos de colágeno alterarem o perfil de progressão do fenótipo osteoblástico, favorecendo a diferenciação de osteoblastos maduros (LYNCH et al., 1995), vários grupos de pesquisa vêm buscando desenvolver superfícies de Ti recobertas com essa molécula (BECKER et al., 2000; GEISLER et al., 2000; ROEHLECKE et al., 2001; MORRA et al., 2003; RAMMELT et al., 2004; MORRA et al., 2005; MORRA et al., 2006; RAMMELT et al., 2006; VAN DEN DOLDER; JANSEN, 2007). Apesar de o colágeno I estar intimamente associado aos processos de adesão, migração, proliferação e diferenciação celulares (QIAN; BHATNAGAR, 1996; SODEK; MCKEE, 2000; NGUYEN et al., 2003), a eficácia desses recobrimentos em suscitar respostas biológicas é ainda objeto de discussão (KIM et al., 2005). Além disso, procedimentos técnicos são realizados visando a minimizar potenciais efeitos antigênicos e imunogênicos do colágeno. Embora raras, evidências clínicas de reações adversas a matrizes colágenas acelulares podem efetivamente ocorrer (LYNN et al., 2004).

O desenvolvimento de recobrimentos biomiméticos baseados nas características bioquímicas da molécula de colágeno destaca-se, portanto, como uma alternativa promissora à funcionalização de superfícies de implantes. Análises da estrutura molecular do colágeno permitiram identificar um potente domínio de ligação celular em seqüência da cadeia $\alpha 1(I)$, relacionado principalmente aos processos de adesão e diferenciação celulares (BHATNAGAR et al., 1997; BHATNAGAR et al., 1999). Esses estudos levaram à síntese do polipeptídeo P-15, que mimetiza a seqüência de aminoácidos contida nos resíduos 766-780 da cadeia

de colágeno, referida como GTPGPQGIAGQRGVV. O P-15 é, aproximadamente, 4500 vezes mais potente que seqüências RGD na competição por ligação a receptores celulares (BHATNAGAR et al., 1999).

Estudos *in vitro* demonstraram que o P-15, combinado à matriz óssea inorgânica bovina (PepGen P-15®, DENTSPLY Friadent), promove os processos de migração, diferenciação e morfogênese celulares (QIAN; BHATNAGAR, 1996; BHATNAGAR et al., 1999; LALLIER et al., 2001; HANKS; ATKINSON, 2004); na forma de hidrogel, favorece a formação de nódulos de matriz mineralizada (NGUYEN et al., 2003). Estudos *in vivo* demonstraram que o P-15 tem sido utilizado com sucesso no tratamento de defeitos ósseos periodontais (YUKNA et al., 1998; YUKNA et al., 2000; YUKNA et al., 2002; BARROS et al., 2006; ETO et al., 2007; SUAID et al., 2010), na preservação de rebordo alveolar após extração (BARBOZA et al., 2002; NEIVA et al., 2008) e como material de enxerto para levantamento de seio maxilar (KRAUSER et al., 2000; SMILER, 2001; DEGIDI et al., 2004). Pelos resultados promissores do P-15, a DENTSPLY Friadent desenvolveu um método para imobilização de diferentes concentrações desse polipeptídeo sintético sobre a superfície Plus recoberta com camada de hidroxiapatita (*proprietary processing/segredo industrial*), visando a potencializar o processo de neoformação óssea nos sítios de implantação. Apesar de não haver estudos *in vitro* sobre os efeitos da funcionalização de microtopografias de Ti com P-15 sobre o desenvolvimento do fenótipo osteogênico, avaliações iniciais em modelo animal apontam para benefícios em parâmetros da osteogênese ao redor de implantes (BARROS et al., 2009; LUTZ et al., 2010).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Auernheimer J, Zukowski D, Dahmen C, Kantlehner M, Enderle A, Goodman SL, Kessler H. Titanium implant materials with improved biocompatibility through coating with phosphonate-anchored cyclic RGD peptides. *Chembiochem* 2005;6:2034-2040.

Barboza EP, de Souza RO, Caula AL, Neto LG, Caula FD, Duarte MEL. Bone regeneration of localized chronic alveolar defects utilizing cell binding peptide associated with anorganic bovine-derived bone mineral: A clinical and histological study. *J Periodontol* 2002;73:1153-1159.

Barros RR, Novaes AB Jr, Papalexiou V, Souza SL, Taba M Jr, Palioto DB, Grisi MF. Effect of biofunctionalized implant surface on osseointegration: a histomorphometric study in dogs. *Braz Dent J* 2009;20:91-98.

Barros RRM, Novaes AB, Roriz VM, de Oliveira RR, Grisi MFM, Souza, SLS, Taba M, Palioto DB. Anorganic bovine matrix/P-15 "flow" in the treatment of periodontal defects: Case series with 12 months of follow-up. *J Periodontol* 2006;77:1280-1287.

Becker D, Geissler U, Hempel U, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H, Wenzel KW. Proliferation and differentiation of rat calvarial osteoblasts on type I collagen-coated titanium alloy. *J Biomed Mater Res* 2000;59:516-527.

Beutner R, Michael J, Schwenzer B, Scharnweber D. Biological nano-functionalization of titanium-based biomaterial surfaces: a flexible toolbox. *J R Soc Interface* 2010;7:S93-S105.

Bhatnagar RS, Qian JJ, Gough CA. The role in cell binding of a b-bend within the triple helical region in collagen $\alpha 1$ (I) chain: structural and biological evidence for conformational tautomerism on fiber surface. *J Biomol Struct Dyn* 1997;14:547-560.

Bhatnagar RS, Qian JJ, Wedrychowska A, Sadeghi M, Wu YM, Smith N. Design of biomimetic habitats for tissue engineering with P-15, a synthetic peptide analogue of collagen. *Tissue Eng* 1999;5:53-65.

Boyan BD, Lossdorfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann CH, Cochran DL, Schwartz Z. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur Cells Mater* 2003;6:22-27.

Brunski JB, Puleo DA, Nanci A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:15-46.

Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann SG. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 2004;83:529-533.

Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 1998;11:391-401.

Degidi M, Piattelli M, Scarano A, Iezzi G, Piattelli A. Maxillary sinus augmentation with a synthetic cell-binding peptide: histological and histomorphometrical results in humans. *J Oral Implantol* 2004;30:376-383.

Di Iorio D, Traini T, Degidi M, Caputi S, Neugebauer J, Piattelli A. Quantitative evaluation of the fibrin clot extension on different implant surfaces: an in vitro study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;74:636-642.

Elmengaard B, Bechtold JE, Soballe K. In vivo effects of RGD-coated titanium implants inserted in two bone-gap models. *J Biomed Mater Res A* 2005;75:249-255.

Eto AL, Joly JC, Jeffcoat M, de Araújo NS, de Araújo VC, Cury PR. Use of Anorganic Bovine-Derived Hydroxyapatite Matrix/Cell-Binding Peptide (P-15) in the Treatment of Class II Furcation Defects: A Clinical and Radiographic Study in Humans. *J Periodontol* 2007;78:2277-2283.

García AJ, Reyes CD. Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation. *J Dent Res* 2005;84:407-413.

Geissler U, Hempel U, Wolf C, Scharnweber D, Worch H, Wenzel KW. Collagen type I coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts. *J Biomed Mater Research* 2000;51:752-760.

Hanks T, Atkinson BL. Comparison of cell viability on anorganic bone matrix with or without P-15 cell binding peptide. *Biomaterials* 2004;25:4831-4836.

Healy KE, Rezania A, Stile RA. Designing biomaterials to direct biological responses. *Ann N Y Acad Sci* 1999;875:24-35.

Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996;7:329-345.

Kim HW, Li LH, Lee EJ, Lee SH, Kim HE. Fibrillar assembly and stability of collagen coating on titanium for improved osteoblast responses. *J Biomed Mater Res A* 2005;75:629-638.

Krauser JT, Rohrer MD, Wallace SS. Human histologic and histomorphometric analysis comparing OsteoGraf/N with PepGen P-15 in the maxillary sinus elevation procedure: a case report. *Implant Dent* 2000;9:298-302.

Lallier TE, Yukna R, Marie SS, Moses R. The putative collagen binding peptide hastens periodontal ligament cell attachment to bone replacement graft materials. *J Periodontol* 2001;72:990-997.

Lossdorfer S, Schwartz Z, Wang L, Lohmann CH, Turner JD, Wieland M, Cochran DL, Boyan BD. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *J Biomed Mater Res A* 2004;3:361-369.

Lutz R, Srour S, Nonnhoff J, Weisel T, Damien CJ, Schlegel KA. Biofunctionalization of titanium implants with a biomimetic active peptide (P-15) promotes early osseointegration. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:726-734.

Lynch MP, Stein JL, Stein GS, Lian JB. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res* 1995;216:35-45.

Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004;71:343-354.

Matsuzaka K, Walboomers XF, Yoshinari M, Inoue T, Jansen JA. The attachment and growth behavior of osteoblast-like cells on microtextured surfaces. *Biomaterials* 2003;24:2711-2719.

Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Cahalan P, Cahalan L, Fini M, Giardino R. Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies. *Biomaterials* 2003;24:4639-4654.

Morra M, Cassinelli C, Meda L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Surface analysis and effects on interfacial bone microhardness of collagen-coated titanium implants: a rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:23-30.

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

Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Mazzucco L, Borzini P, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Collagen I-coated titanium surfaces: mesenchymal cell adhesion and in vivo evaluation in trabecular bone implants. *J Biomed Mater Res A* 2006;78:449-458.

Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, McKee MD. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res* 1998;40:324-335.

Neiva RF, Tsao Y, Eber R, Shotwell J, Billy E, Wang H. Effects of a putty-form hydroxyapatite matrix combined with the synthetic cell-binding peptide P-15 on alveolar ridge preservation. *J Periodontol* 2008;79:291-299.

Nguyen H, Qian JJ, Bhatnagar RS, Li S. Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:179-186.

Park JY, Davies JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2000;11:530-539.

Park JY, Gemmell CH, Davies JE. Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials* 2001;22:2671-2682.

Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999;20:2311-2321.

Qian JJ, Bhatnagar RS. Enhanced cell attachment to anorganic bone mineral in the presence of a synthetic peptide related to collagen. *J Biomed Mater Res* 1996;31:545-554.

Rammelt S, Schulze E, Bernhardt R, Hanisch U, Scharnweber D, Worch H, Zwipp H, Biewener A. Coating of titanium implants with type-I collagen. *J Orthop Res* 2004;22:1025-1034.

Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, Scharnweber D, Zwipp H, Schneiders W. Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials* 2006;27:5561-5571.

Rezania A, Johnson R, Lefkow AR, Healy KE. Bioactivation of metal oxide surfaces. 1. Surface characterization and cell response. *Langmuir* 1999;15:6931-6939.

Roehlecke C, Witt M, Kasper M, Schulze E, Wolf C, Hofer A, Funk RW. Synergistic effect of titanium alloy and collagen type I on cell adhesion, proliferation and differentiation of osteoblastlike cells. *Cells Tissues Organs* 2001;168:178-187.

Rosei F. Nanostructured surfaces: challenges and frontiers in nanotechnology. *J Physics: Condensed Matter* 2004;16:1373-1436.

Rupp F, Scheideler L, Olshanska N, de Wild M, Wieland M, Geis-Gerstorfer J. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2006;76:323-334.

Schliephake H, Scharnweber D, Dard M, Rossler S, Sewing A, Meyer J, Hoogestraat D. Effect of RGD peptide coating of titanium implants on periimplant bone formation in the alveolar crest. An experimental pilot study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:312-319.

Schliephake H, Scharnweber D, Dard M, Sewing A, Aref A, Roessler S. Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules. *J Biomed Mater ResB Appl Biomater* 2005;73:88-96.

Schwartz FO, Novaes AB Jr, de Castro LMS, Rosa AL, de Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res* 2007;18:333-344.

Senyah N, Hildebrand G, Liefelth K. Comparison between RGD-peptide-modified titanium and borosilicate surfaces. *Anal Bioanal Chem* 2005;383:758-762.

Smiler DG. Comparison of anorganic bovine mineral with and without synthetic peptide in a sinus elevation: a case study. *Implant Dent* 2001;10:139-142.

Sodek J, McKee M. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000 2000;24:99-126.

Suaid FA, Macedo GO, Novaes AB, Borges GJ, Souza SL, Taba M, Palioto DB, Grisi MF. The bone formation capabilities of the anorganic bone matrix-synthetic cell-binding peptide 15 grafts in an animal periodontal model: a histologic and histomorphometric study in dogs. *J Periodontol* 2010;81:594-603.

Tan J, Saltzman WM. Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure. *Biomaterials* 2004;25:3593-3601.

Tosatti S, Schwartz Z, Campbell C, Cochran DL, VandeVondele S, Hubbell JA, Denzer A, Simpson J, Wieland M, Lohmann CH, Textor M, Boyan BD. RGD-containing peptide GCRGYGRGDSPG reduces enhancement of osteoblast differentiation by poly(L-lysine)-graft-poly(ethylene glycol)-coated titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2004;68:458-472.

van den Dolder J, Jansen JA. The response of osteoblast-like cells towards collagen type I coating immobilized by p-nitrophenylchloroformate to titanium. *J Biomed Mater Res A* 2007;83:712-719.

Wieland M, Textor M, Chehroudi B, Brunette DM. Synergistic interaction of topographic features in the production of bone-like nodules on Ti surfaces by rat osteoblasts. *Biomaterials* 2005;26:1119-1130.

Xiao SJ, Textor M, Spencer ND, Wieland M, Keller B, Sigrist H. Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *J Mater Sci Mater Med* 1997;8:867-872.

Xiao SJ, Textor M, Spencer ND, Sigrist H. Covalent attachment of cell-adhesive, (Arg-Gly-Asp)-containing peptides to titanium surfaces. *Langmuir* 1998;14:5507-5516.

Yukna RA, Callan DP, Krauser JT, Evans GH, Aichelmann-Reidy ME, Moore K, Cruz R, Scott JB. Multi-center clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. 6-month results. *J Periodontol* 1998;69:655-663.

Yukna RA, Krauser JT, Callan DP, Evans GH, Cruz R, Martin M. Multi-center clinical comparison of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) and ABM in human periodontal osseous defects. 6-month results. *J Periodontol* 2000;71:1671-1679.

Yukna RA, Krauser JT, Callan DP, Evans GH, Cruz R, Martin M. Thirty-six month follow-up of 25 patients treated with combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell-binding peptide (P-15) bone replacement grafts in human infrabony defects. I. Clinical findings. *J Periodontol* 2002;73:123-128.

Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan BD. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 2005;74:49-58.

Zinger O, Anselme K, Denzer A, Habersetzer P, Wieland M, Jeanfils J, Hardouin P, Landolt D. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials* 2004;25:2695-2711.

RESUMO

Os eventos celulares e extracelulares que ocorrem durante o processo de osseointegração do titânio (Ti) são influenciados pelas propriedades físicas e químicas de sua superfície. Modificações bioquímicas de topografias complexas de Ti permitem o desenvolvimento de novas superfícies de implantes funcionalizadas com moléculas bioativas, visando a promover a osteogênese de contato e a osseointegração. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos, sobre a osteogênese *in vitro*, da funcionalização de microtopografia de Ti com concentrações distintas de peptídeo sintético análogo a uma seqüência de aminoácidos do colágeno tipo I, relacionada a adesão e diferenciação celulares. Células osteogênicas primárias derivadas de calvárias de ratos foram plaqueadas sobre superfícies de Ti: 1) usinada e lixada (Usinado); 2) com microtopografia (Plus); 3) Plus com recobrimento de hidroxiapatita (Plus+HA); 4) Plus+HA, com baixa concentração de P-15 (P-15 low); 5) Plus+HA, com alta concentração de P-15 (P-15 high). Por períodos de até 21 dias, foram avaliados: morfologia celular e estágios de adesão e espreadimento celulares; viabilidade celular, proporção de células no ciclo celular e número total de células; imunolocalização de proteínas da matriz extracelular não-colágena; expressão de marcadores do fenótipo osteoblástico por reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real-time* PCR); atividade de fosfatase alcalina (ALP); proporção de células em apoptose e formação de matriz mineralizada. Avaliaram-se, também, os aspectos topográficos das superfícies, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de alta resolução, e o molhamento de superfície, pelo método da gota séssil. As superfícies Plus modificadas

apresentavam camada superficial constituída por agregados de material acicular, os quais eram menos evidentes em P-15 high. Todas as superfícies eram hidrofóbicas, sendo que a funcionalização com P-15 proporcionava tendência à hidrofilicidade em equilíbrio. Após 4 h, observou-se que as superfícies com microtopografia apresentavam menor proporção de células nos estágios 3 e 4 de espraio quando comparadas com o Usinado ($p<0,05$). A viabilidade celular por MTT demonstrou valores maiores para as superfícies Plus modificadas aos 3 dias ($p<0,05$). Em 1 dia, acúmulos extracelulares de osteopontina (OPN) foram evidentes apenas sobre Plus+HA, P-15 low e P-15 high, com maior extensão em 3 dias. Em 7 dias, áreas imunomarcadas para sialoproteína óssea (BSP) eram menos extensas sobre Plus e Plus+HA. Para os grupos com microtopografia, foram observados valores de RNAm: menores para RUNX2 em 7 dias em comparação ao Usinado; para fosfatase alcalina (ALP), maiores em 10 se comparados a 7 dias; menores para BSP e maiores para OPN em 7 e 10 dias, quando comparados ao Usinado. Em 10 dias, observou-se redução significativa ($p<0,05$) na atividade de ALP nas superfícies com microtopografia em comparação ao Usinado. Aos 14 dias, formações nodulares típicas de matriz mineralizada, marcadas para BSP em sua periferia, foram observadas apenas nos grupos Usinado e Plus. No entanto, a quantificação do vermelho de Alizarina (ARS) revelou valores maiores para as culturas sobre superfícies Plus modificadas em 14 e 21 dias ($p<0,05$). Concluiu-se que a microtopografia de Ti Plus, nanoestruturada com HA para funcionalização de P-15, altera o processo de aquisição do fenótipo osteogênico *in vitro*, resultando no aumento da formação de matriz calcificada, em padrão predominantemente diferente ao de típicas formações nodulares observadas sobre superfícies planas na microescala.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
JUSTIFICATIVA.....	xvi
RESUMO.....	xxviii
1 INTRODUÇÃO	32
2 MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1 Caracterização das superfícies de Ti	36
2.2 Isolamento celular e culturas de células osteogênicas.....	37
2.3 Morfologia celular e estágios de adesão e espraiamento celular	38
2.4 Determinação da viabilidade celular, da proporção de células no ciclo celular e do número total de células	38
2.5 Imunolocalização de osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP) e do antígeno nuclear Ki-67	40
2.6 Análise do grau de diferenciação osteoblástica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (<i>Real-time</i> PCR).....	41
2.7 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)	42
2.8 Ensaio para detecção de células em apoptose	43
2.9 Detecção de acúmulos de cálcio (formação de matriz mineralizada).....	43
2.10 Análise estatística	44
3 RESULTADOS.....	46
3.1 Análise por MEV da topografia dos discos de Ti e da morfologia celular	46
3.2 Molhamento de superfície	48
3.3 Estágios de adesão e espraiamento celular	49
3.4 Viabilidade celular	50
3.5 Proliferação celular.....	51
3.6 Número total de células.....	52
3.7 Imunolocalização de BSP e OPN.....	53
3.8 Análise do grau de diferenciação osteoblástica por <i>Real time</i> PCR.....	55
3.9 Atividade de ALP	59
3.10 Ensaio para detecção de células em apoptose	60
3.11 Formação de matriz mineralizada	61
4 DISCUSSÃO	66
5 CONCLUSÃO	73
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

INTRODUÇÃO

---

1 INTRODUÇÃO

Na Implantodontia, uma das estratégias utilizadas para promover os eventos biológicos que ocorrem na região interfacial durante o processo de osseointegração é a modificação de superfície dos implantes, uma vez que as interações de células e tecidos com os biomateriais são afetadas pelas características físicas e químicas de sua superfície (KIESWETTER et al., 1996; BRUNSKI et al., 2000). Em relação às modificações nos aspectos topográficos, estudos *in vitro* e em modelos animais têm demonstrado que superfícies estruturadas na microescala (1-10 μm) favorecem a osseointegração por meio de alguns fatores, destacando-se: 1) formação de coágulo de fibrina e ativação de plaquetas mais precoces (DAVIES, 1998; PARK; DAVIES, 2000; PARK et al., 2001; DI IORIO et al., 2005), 2) microambiente tridimensional adequado à formação óssea (MATSUZAKA et al., 2003), 3) aumento da síntese e secreção de fatores de crescimento com efeitos sobre o tecido ósseo (BOYAN et al., 2003) e 4) redução da atividade osteoclástica controlada por fatores secretados por osteoblastos (LOSSDORFER et al., 2004). Estudos mais recentes revelam que associações de micro e submicrotopografias (entre 100-150 nm e menores do que 1 μm ; ROSEI, 2004) promovem efeitos de sinergismo nas respostas teciduais, resultando em aumento da proliferação celular (ZINGER et al., 2004; TAN; SALTZMAN, 2004), de atividades celulares (TAN; SALTZMAN, 2004), da expressão de marcadores da diferenciação osteoblástica (MENDONÇA et al., 2010) e da formação de nódulos de matriz mineralizada *in vitro* (WIELAND et al., 2005).

As superfícies de biomateriais podem ser também modificadas por métodos bioquímicos, visando à disponibilização de proteínas, enzimas ou peptídeos

bioativos para a indução de respostas celulares e teciduais específicas na região interfacial (PULEO; NANJI, 1999; MORRA, 2006; BEUTNER et al., 2010). Inicialmente foram desenvolvidas superfícies de Ti modificadas com peptídeos e/ou proteínas com seqüências Arginina-Glicina-Aspartato (Arg-Gly-Asp ou RGD), as quais favorecem os processos de adesão celular e sinalização celular via transdução de sinais (TOSATTI et al., 2004), com efeitos favoráveis para a diferenciação de osteoblastos (XIAO et al., 1997; XIAO et al., 1998; HEALY; REZANIA, 1999; REZANIA et al., 1999; SCHLIEPHAKE et al., 2002; AUERNHEIMER et al., 2005; ELMENGAARD et al., 2005; GARCIA; REYES, 2005; SCHLIEPHAKE et al., 2005; SENYAH et al., 2005).

Como a molécula de colágeno I é o principal constituinte da matriz orgânica do tecido ósseo, intimamente associada aos processos de adesão, migração, proliferação e diferenciação celulares (QIAN; BHATNAGAR, 1996; SODEK; MCKEE, 2000; NGUYEN et al., 2003), observa-se crescente interesse em utilizá-la como recobrimento biomimético. Superfícies de Ti recobertas com colágeno I apresentam maior espalhamento celular e formação mais rápida de adesões focais (GEISSLER et al., 2000; MORRA et al., 2003), modificações no perfil de expressão de RNAm de marcadores da diferenciação osteoblástica (DE ASSIS et al., 2009), com tendência à maior formação óssea adjacente a implantes em tíbia de ratos (RAMMELT et al., 2004).

Pesquisas relacionadas ao recobrimento biomimético com colágeno permitiram identificar um potente domínio de ligação celular em seqüência da cadeia $\alpha 1(I)$, envolvido nos processos de adesão e diferenciação celulares (BHATNAGAR et al., 1997; BHATNAGAR et al., 1999). Esses estudos levaram à síntese do polipeptídeo P-15, que mimetiza a seqüência de aminoácidos contida nos resíduos

766-780 da cadeia de colágeno, referida como GTPGPQGIAGQRGVV. O P-15 é, aproximadamente, 4500 vezes mais potente que seqüências RGD na competição por ligação a receptores celulares (BHATNAGAR et al., 1999). Estudos *in vitro* demonstraram que o P-15 combinado à matriz óssea inorgânica bovina (PepGen P-15®, DENTSPLY Friadent, Mannheim, Alemanha) promove os processos de migração, diferenciação e morfogênese celulares (QIAN; BHATNAGAR, 1996; BHATNAGAR et al., 1999; LALLIER et al., 2001; HANKS; ATKINSON, 2004); na forma de hidrogel, favorece a formação de nódulos de matriz mineralizada (NGUYEN et al., 2003). Estudos *in vivo* demonstraram que o P-15 tem sido utilizado com sucesso no tratamento de defeitos ósseos periodontais (YUKNA et al., 1998; YUKNA et al., 2000; YUKNA et al., 2002; BARROS et al., 2006; ETO et al., 2007; SUAID et al., 2010), na preservação de rebordo alveolar após extração (BARBOZA et al., 2002; NEIVA et al., 2008) e como material de enxerto para levantamento de seio maxilar (KRAUSER et al., 2000; SMILER, 2001; DEGIDI et al., 2004). Pelos resultados promissores do P-15, desenvolveu-se um método para imobilização de diferentes concentrações desse polipeptídeo sintético sobre a superfície Plus, utilizando recobrimento de hidroxiapatita (DENTSPLY Friadent, *proprietary processing*/segredo industrial), visando a potencializar o processo de neoformação óssea nos sítios de implantação. No entanto, avaliações dessas superfícies utilizando modelo de osteogênese *in vitro* ainda não foram realizadas.

O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da funcionalização de superfícies de Ti Plus com duas concentrações do peptídeo sintético P-15 sobre importantes eventos do desenvolvimento do fenótipo osteogênico *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

---

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização das superfícies de Ti

Para os experimentos com culturas de células osteogênicas, foram utilizados discos de Ti de 13 mm de diâmetro e 2 mm de altura, caracterizados por 5 superfícies distintas: 1) usinada e lixada (Usinado; Realum, São Paulo, Brasil); 2) com microtopografia obtida por jateamento e condicionamento ácido, em processo semelhante ao aplicado a implantes (Plus, DENTSPLY Friadent); 3) Plus com recobrimento de hidroxiapatita (PLUS+HA); 4) Plus com recobrimento de HA, contendo baixa concentração de P-15 (P-15 low); 5) Plus com recobrimento de HA, contendo alta concentração de P-15 (P-15 high).

Os grupos 1 e 2 serviram como controles da funcionalização da superfície Plus com diferentes concentrações de P-15.

As amostras foram preparadas e esterilizadas pelo Dr. Dieter Scharnweber, da *Technische Universität Dresden, Institut für Werkstoffwissenschaft - Materials Science* (Dresden, Alemanha). Os processos de obtenção de todas as superfícies experimentais não foram revelados (*proprietary processing*/segredo industrial). Todas as superfícies foram caracterizadas quanto à topografia e ao molhamento. As características de topografia das superfícies foram avaliadas, qualitativamente, por microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol JSM 7400F, operado a 1,5 kV, do *Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials* da *Université de Montréal* (Canadá). O molhamento da superfície foi determinado pela medida inicial (tempo 0) e em equilíbrio (após 5 min) do ângulo de contato estático pelo método da gota séssil (ADAMSON; GAST, 1997) com medidor OCA-20 (DataPhysics

Instruments, Bonlanden, Alemanha), usando uma gota de meio de cultura com suplementos (descrito abaixo) sobre todas as superfícies, à temperatura de 28°C.

2.2 Isolamento celular e culturas de células osteogênicas

As células foram isoladas por digestão enzimática sequencial, com solução de tripsina e colagenase, de fragmentos de calvárias de ratos Wistar recém-nascidos, com 2-4 dias (NANCI et al., 1996; IRIE et al., 1998; DE OLIVEIRA et al., 2003; DE OLIVEIRA; NANCI, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2007; SCHWARTZ FO et al., 2007). Todos os procedimentos com animais estavam de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do *Campus* de Ribeirão Preto da USP (Protocolo nº 08.1.357.53.6). As células foram plaqueadas sobre os discos de Ti contidos em placas de 24 poços, na densidade de 2×10^4 células/poço, e foram cultivadas por períodos de até 21 dias em Meio Essencial Mínimo, modificação α , com L-glutamina (α -MEM; Invitrogen, Carlsbad, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 7 mM de β -glicerofosfato (Sigma, St Louis, EUA), 50 μ g/mL de gentamicina (Invitrogen), 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Sigma) a 37°C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias e a progressão da cultura foi avaliada por microscopia de fase em culturas crescidas sobre poliestireno.

Para a avaliação da morfologia celular por MEV, foram utilizadas células MC3T3-E1, de linhagem osteoblástica de camundongos (MOFFATT et al., 2008; VETRONE et al., 2009), plaqueadas sobre os discos de Ti contidos em placas de 24 poços, na densidade de 2×10^4 células/poço, e cultivadas por 3 dias em meio de cultura de mesma composição daquela utilizada para as culturas primárias.

2.3 Morfologia celular e estágios de adesão e espraio celular

A adesão e espraio celular foram avaliados por fluorescência direta utilizando faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, EUA), para marcação do citoesqueleto de actina ubiquitária, e *4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride* (DAPI, Molecular Probes), para marcação do DNA nuclear (descrição detalhada no item 2.5).

Para determinar as proporções de células nos diferentes estágios de adesão e espraio (RAJARAMAN et al., 1974), células nos estágios 1 (células esféricas), 2 (células esféricas com filipódios), 3 (células com filipódios e lamelipódios) e 4 (células espraídas) foram quantificadas avaliando-se 100 células aderidas no tempo de 4 h de cultura primária para cada superfície, usando campos microscópicos selecionados aleatoriamente, em objetiva de 40X.

A morfologia celular foi também avaliada por MEV. No 3º dia de cultura, células MC3T3-E1 foram fixadas com solução de glutaraldeído a 5% (Sigma) tamponada com cacodilato de sódio a 0,06 M, pH 7,2 (Sigma) e rotineiramente processadas para MEV, de acordo com De Oliveira e Nanci (2004). As amostras foram avaliadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 7400F, operado a 1,5 kV, do *Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials*.

2.4 Determinação da viabilidade celular, da proporção de células no ciclo celular e do número total de células

Em 1, 3 e 7 dias, a viabilidade celular foi avaliada nos diferentes grupos pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma), um sal que é reduzido por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis (MOSMANN, 1983). Alíquotas de MTT a 5 mg/mL em solução

tampão salina de fosfato (*Phosphate buffered saline* – PBS; Gibco, Invitrogen) foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação das culturas primárias com esta solução a 10% em meio de cultura, por 4 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse período, as culturas foram lavadas com 1 mL de PBS aquecido. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de isopropanol ácido (100 mL de isopropanol e 134 µL de HCl) em cada poço sob agitação por 5 min, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 200 µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (µQuant, BioTek Instruments, Inc., Winooski, EUA), utilizando comprimento de onda de 570 nm.

Em 3 dias, foi determinada a proporção de células no ciclo celular por imunomarcagem ao antígeno nuclear Ki-67, expresso apenas por células durante o ciclo celular e não por células em G0 (SCHOLZEN; GERDES, 2000). Foram avaliados, por epifluorescência, 5 discos de cada grupo experimental, em objetiva de 40X, determinando-se a proporção de células Ki-67 positivas de um total de células aderidas e espreiadas não inferior a 100 (3 a 5 campos microscópicos), quantificadas pela marcação do DNA nuclear por DAPI. Os métodos de imunofluorescência indireta, para a localização de Ki-67, e fluorescência direta, para marcação do DNA nuclear por DAPI, estão descritos no item 2.5.

Para quantificar o número total de células em 7 dias, células osteogênicas foram enzimaticamente destacadas das superfícies de Ti por ação de solução contendo 1,5 mL de EDTA a 1mM, 1,3 mg/mL de collagenase e tripsina a 0,25% (Gibco, Invitrogen). O número de células viáveis e não viáveis foi contado por meio de hemocitômetro, após a marcação com azul de Tripan (Sigma). O resultado foi expresso como o número total de células por poço.

2.5 Imunolocalização de osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP) e do antígeno nuclear Ki-67

Em 1, 3, 7, 10 e 14 dias, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 (PB), por 10 min à temperatura ambiente (TA). Em seguida, as células foram processadas rotineiramente para imunofluorescência indireta (DE OLIVEIRA; NANJI, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2007; SCHWARTZ FO et al., 2007). As células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 a 0,5% (Acros Organics, Geel, EUA) em PB por 10 min, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 min. Utilizaram-se anticorpos primários monoclonais para BSP (1:200, WVID1-9C5, *Developmental Studies Hybridoma Bank* – DSHB, Iowa City, EUA) e OPN (1:800, MP11B10-1, DSHB), e policlonal para Ki-67 (1:70, Diagnostic Biosystems, Pleasanton, EUA), seguidos de anticorpos secundários conjugados com fluoróforo Alexa Fluor 594 (fluorescência vermelha; 1:200, Molecular Probes) em mesma solução de faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; 1:200, Molecular Probes), para visualização do citoesqueleto de actina. Para duplas marcações BSP/vermelho de Alizarina (ARS; Sigma) (DE OLIVEIRA et al., 2007; DE OLIVA et al., 2009), utilizou-se anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; 1:200, Molecular Probes). Todas as incubações dos anticorpos foram feitas em atmosfera úmida por 60 min à TA. Entre cada incubação, as amostras foram lavadas três vezes (5 min cada) em PB. Antes da montagem para observação microscópica, as amostras foram lavadas rapidamente com água destilada e os núcleos celulares, marcados com DAPI (Molecular Probes) a 300 nM por 5 min. Os discos foram montados em lâminas de vidros, e em seguida, após montagem de lamínula de vidro Fisherbrand 12 mm (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) com meio de montagem *anti-fade* (Vectashield,

Vector Labs, Burlingame, EUA) sobre as superfícies contendo células, as amostras foram examinadas em microscópio de fluorescência Leica DMLB (Leica, Bensheim, Alemanha) acoplado a uma câmera digital. As imagens adquiridas foram processadas com o programa Adobe Photoshop.

2.6 Análise do grau de diferenciação osteoblástica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real-time* PCR)

A expressão de marcadores do fenótipo osteoblástico foi avaliada por *Real-time* PCR, quantificando-se os seguintes genes: BSP, fosfatase alcalina (ALP), fator de transcrição relacionado ao *runt* tipo 2 (Runx2) e OPN. Como controle foi avaliada a expressão do gene constitutivo GAPDH.

Nos tempos de 7 e 10 dias, foi realizada a extração do RNA total através do kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320 nm) no aparelho GeneQuant 1300 (GE Healthcare, Cardiff, Reino Unido).

Após extração do RNA total, o cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA por reação de transcrição reversa utilizando o *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foram adicionados ao RNA: 2 µL de (10X) *RT buffer*, 0,8 µL de (25X) *dNTP mix* (100 mM), 2 µL (10X) *RT Random Primers*, 1 µL de *MultiScribe Reverse Transcriptase*, 1 µL de *RNase Inhibitor* e 3,2 µL de água DEPC, para um volume final de 20 µL/reação. Em seguida, a amostra foi incubada a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 85°C por 5 min, seguido pelo resfriamento a 4°C. Ao

final da reação a amostra foi mantida refrigerada e o cDNA foi estocado em freezer a -20°C .

Para a reação de *Real-time* PCR, foram utilizadas sondas TaqMan® (Applied Biosystems) sendo as reações feitas em aparelho CFX96 (Bio-Rad, Hercules, EUA). As reações de PCR em tempo real realizadas pelo sistema de sondas TaqMan foram preparadas para um volume final de 10 μL por reação. Para cada reação, foram adicionados 5 μL de *TaqMan Universal PCR Master Mix-No AmpErase UNG* (2X), 0,5 μL das sondas TaqMan para os genes de interesse (20X *TaqMan Gene Expression Assay Mix*) e 11,25 ng de cDNA. As reações consistiram em 2 minutos a 50°C , 10 min a 95°C , e quarenta ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C . Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cicle threshold* – ou ciclo limiar) e todas as amostras foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para o gene de expressão constitutiva GAPDH e uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada sonda TaqMan utilizada. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Usando o método de $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, os dados foram representados como diferença (em vezes) na expressão gênica normalizada pelo gene constitutivo. Atribuiu-se valor 1 para cada marcador em culturas sobre a superfície usinada em 7 dias, permitindo, assim, comparações entre grupos e tempos experimentais.

2.7 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de ALP foi avaliada no 10^o dia, através da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando *kit* comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica, Belo

Horizonte, Brasil). Primeiramente, 50 μ L de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1, e deixados por 2 min a 37°C. À solução foi, então, acrescentada alíquota de 50 μ L obtida de cada poço, permanecendo por 10 min a 37°C. Para obter a coloração, foram adicionados 2 mL de Na₂CO₃ a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. Após 30 min, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (CE3021; Cecil, Cambridge, Reino Unido) utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade de ALP, medida a partir da curva padrão, usando a timolftaleína em uma escala de 0,012 a 0,4 μ mol de timolftaleína/h/mL. Os dados foram normalizados pelo conteúdo de proteína total, que foi determinado pelo método de Lowry modificado (LOWRY et al., 1951).

2.8 Ensaio para detecção de células em apoptose

No tempo de 10 dias, determinou-se, por citometria de fluxo, a proporção de células que exibem alterações na membrana plasmática que ocorrem nos eventos iniciais do processo de apoptose. Para isso, as células foram tripsinizadas e marcadas com anexina V e iodeto de propídeo (IP), utilizando o kit Apoptest-FITC (Dako, Glostrup, Dinamarca). Após análise por citômetro de fluxo (FACS Canto, BD Bioscience, San Jose, EUA), foram quantificadas quatro populações celulares: 1) anexina V-/IP- (células viáveis), 2) anexina V+/IP- (células em estágios iniciais de apoptose), 3) anexina V+/IP+ (células em estágios avançados de apoptose) e 4) anexina V-/IP+ (células necróticas).

2.9 Detecção de acúmulos de cálcio (formação de matriz mineralizada)

Em 14 e 21 dias, as culturas primárias crescidas sobre os discos de Ti foram lavadas em solução de Hanks, fixadas em álcool etílico a 70% a 4°C por 60 min e

lavadas em PBS e água destilada. Em seguida, foram coradas ARS (Sigma) a 2%, pH 4,2, à TA por 15 min. Após lavagem em água destilada, as culturas foram processadas para tripla marcação com anticorpo anti-BSP (WVID1-9C5) e DAPI, como descrito no item 2.5. As imagens foram obtidas, digitalmente, por epifluorescência em microscópio Leica DMLB e por câmara de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel, 6.3 megapixels, com lente macro EF100 f/2.8; Canon, Lake Success, EUA).

Acúmulos de cálcio foram quantitativamente determinados pelo método de extração de ARS (GREGORY et al., 2004). Em cada poço contendo os discos de Ti corados com ARS, foram adicionados 280 µL de ácido acético a 10% e a placa, deixada sob agitação suave por 30 min. A camada de células foi, então, raspada com um raspador de células e a solução, transferida para tubos de 1,5 mL e agitada em vortex por 30 s. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 85°C por 10 min, resfriadas em gelo por 5 min e centrifugadas a 13.000 g por 20 min. De cada grupo experimental foram transferidos 100 µL de sobrenadante para placa de 96 poços e adicionados 40 µL de NH₄OH a 10% em cada poço. As amostras foram lidas em espectrofotômetro (µQuanti, BioTek Instruments), utilizando comprimento de onda de 405 nm. A curva padrão foi realizada com dissoluções sucessivas de ARS de 0.5 a 3 mM em acetato de amônia (ácido acético a 10% e NH₄OH a 5 M).

2.10 Análise estatística

Utilizou-se teste paramétrico ou não-paramétrico, para dados independentes (ANOVA ou Kruskal-Wallis, respectivamente), seguido de teste de comparações múltiplas, quando aplicável. O nível de significância foi de 5%. Os resultados são representativos de experimentos realizados com pelo menos duas culturas distintas.

RESULTADOS

---

3 RESULTADOS

3.1 Análise por MEV da topografia dos discos de Ti e da morfologia celular

A análise qualitativa da topografia das superfícies dos discos de Ti demonstrou que as superfícies Plus e Plus modificadas apresentavam-se com concavidades em arranjo complexo na microescala, diferentemente do grupo Usinado, de superfície plana com eventuais sulcos superficiais nas escalas micro e submicrométrica, de distribuição aleatória (Figura 1). Em todas as modificações da Plus, notou-se a presença de camada superficial constituída por agregados de material acicular (*needle-shaped*; Figura 1E, G e I), cujas dimensões variavam entre 100-300 nm em seu longo eixo e eram da ordem de 40 nm em seu diâmetro principal. Esses aspectos tornavam-se menos evidentes para P-15 high.

A análise da morfologia celular revelou, em 3 dias, que as células aderidas sobre as superfícies Plus e Plus modificadas exibiam menor espreadimento se comparadas àquelas sobre o grupo Usinado. Adicionalmente à interação direta do corpo celular com o substrato, a qual era mais óbvia para a superfície plana do grupo Usinado, as células sobre as superfícies Plus e Plus modificadas desenvolviam projeções citoplasmáticas alongadas, de diferentes dimensões, com as quais estabeleciam contato com células adjacentes e com o substrato (Figura 1B, D, F, H e J).

Figure 1. Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução das superfícies de Ti (A,C,E,G,I) e de células MC3T3-E1 aderidas e espreiadas sobre essas superfícies aos 3 dias (B,D,F,H,J). Note-se nas superfícies Plus modificadas (E,G,I, e detalhes) recobrimento de hidroxiapatita, gradualmente menos nítido com o aumento da concentração de P-15. As células nas superfícies Plus encontram-se menos espreiadas se comparadas ao grupo Usinado, exibindo numerosas projeções citoplasmáticas (setas) para sua adesão ao substrato. Barras: A,C,E,F,G,I,J = 2 μ m; destaques em E,G,I = 200 nm; B,D,H = 10 μ m.

3.2 Molhamento de superfície

Observaram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para ângulos de contato inicial e em equilíbrio (ANOVA, $p < 0,05$). O ângulo de contato inicial foi, em média, 80° para Usinado, e superior a 100° para Plus e Plus modificadas. A funcionalização com P-15 reduziu significativamente o ângulo de contato em equilíbrio, para valores da ordem de 40° (Figura 2; Tabelas 1 e 12).

Figura 2. Análise do molhamento de superfície pelo método da gota séssil (ADAMSON; GAST, 1997). Medidas dos ângulos de contato inicial e em equilíbrio utilizando meio de cultura osteogênico.

Tabela 1 – Múltiplas comparações (Pós-teste de Tukey) das medidas dos ângulos de contato inicial e em equilíbrio sobre as diferentes superfícies de Ti

Comparações	Inicial	Equilíbrio
Usinado x Plus	1%	5%
Usinado x Plus+HA	1%	1%
Usinado x P-15 low	5%	NS
Usinado x P-15 high	1%	NS
Plus x Plus+HA	5%	NS
Plus x P-15 low	5%	1%
Plus x P-15 high	NS	1%
Plus+HA x P-15 low	1%	1%
Plus+HA x P-15 high	5%	1%
P-15 low x P-15 high	5%	NS

NS: Não significativa

3.3 Estágios de adesão e espraioamento celular

Culturas crescidas sobre as superfícies Plus e Plus modificadas revelaram uma proporção significativamente menor de células nos estágios 3 e 4 (células espiadas) quando comparadas com o grupo Usinado (Kruskal-Wallis $p < 0,05$; Figuras 3 e 4). Apesar de as proporções de células nos estágios 3 e 4 serem menores para Plus em relação à superfície Usinada, não houve significância estatística para essa comparação (Tabelas 2 e 12).

Figura 3. Epifluorescência de culturas osteogênicas crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti, por período de 4 horas. Marcação em verde indica citoesqueleto de actina e em azul, núcleos celulares. Note-se redução do espiamento celular sobre as superfícies Plus (B) e Plus modificadas (C-E). Objetiva de 40x. Barra = 50 μ m.

Figura 4. Proporção de células osteogênicas em diferentes estágios de adesão e espiamento (de acordo com RAJARAMAN et al., 1974) crescidas sobre diferentes superfícies de Ti em 4 horas.

Tabela 2 – Comparações múltiplas (Pós-teste de Fisher) de proporção de células nos estágios 3 e 4 em culturas osteogênicas crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti, no tempo de 4 horas

Comparações	
Usinado x Plus	NS
Usinado x Plus+HA	1%
Usinado x P-15 low	1%
Usinado x P-15 high	1%
Plus x Plus+HA	NS
Plus x P-15 low	NS
Plus x P-15 high	5%
Plus+HA x P-15 low	NS
Plus+HA x P-15 high	NS
P-15 low x P-15 high	NS

NS: Não significativa

3.4 Viabilidade celular

Em 1, 3 e 7 dias, ensaio MTT revelou valores maiores de viabilidade celular em 3 dias para culturas sobre superfícies Plus modificadas (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$), mas não em 1 e 7 dias ($p > 0,05$) (Figura 5; Tabelas 3 e 12).

Figura 5. Gráfico de barras da viabilidade celular (densidade óptica), determinada pelo ensaio colorimétrico MTT, de culturas osteogênicas crescidas sobre diferentes superfícies de Ti, em 1, 3 e 7 dias.

Tabela 3 – Comparações múltiplas (Pós-teste de Fisher) de viabilidade celular de culturas osteogênicas crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 3 dias

Comparações	
Usinado x Plus	NS
Usinado x Plus+HA	NS
Usinado x P-15 low	1%
Usinado x P-15 high	NS
Plus x Plus+HA	1%
Plus x P-15 low	0,1%
Plus x P-15 high	5%
Plus+HA x P-15 low	NS
Plus+HA x P-15 high	NS
P-15 low x P-15 high	NS

NS: Não significativa

3.5 Proliferação celular

Em 3 dias, não se observaram diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, $p < 0,05$) para as proporções de células Ki-67 positivas sobre os diferentes substratos (Figuras 6 e 7; Tabela 12).

Figura 6. Epifluorescência de culturas osteogênicas crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 3 dias. Imunomarcção para Ki-67 (fluorescência nuclear vermelha) revela que a maioria das células em todos os grupos apresenta-se em atividade proliferativa. Marcação em verde indica citoesqueleto de actina e em azul, núcleos celulares. A redução do espreadimento celular é nítida nas culturas sobre as superfícies Plus (B) e Plus modificadas (C-E). Objetiva de 40x. Barra = 50 μm .

Figura 7. Gráfico de barras do índice de proliferação celular (% de células Ki-67 positivas) de culturas osteogênicas crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 3 dias.

3.6 Número total de células

Em 7 dias, as superfícies Plus e Plus modificadas exibiam menor número total de células quando comparadas ao grupo Usinado (ANOVA, $p < 0,01$) (Figura 8; Tabelas 4 e 12).

Figura 8. Número total de células osteogênicas crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 7 dias. Notem-se valores menores para as superfícies Plus e Plus modificadas.

Tabela 4 – Comparações múltiplas (Pós-teste de Tukey) do número total de células osteogênicas crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 7 dias

Comparações	
Usinado x Plus	1%
Usinado x Plus+HA	1%
Usinado x P-15 low	1%
Usinado x P-15 high	5%
Plus x Plus+HA	NS
Plus x P-15 low	NS
Plus x P-15 high	NS
Plus+HA x P-15 low	NS
Plus+HA x P-15 high	NS
P-15 low x P-15 high	NS

NS: Não significante

3.7 Imunolocalização de BSP e OPN

Em 1 e 3 dias, a marcação para OPN ocorria em uma proporção importante de células osteogênicas, tanto em região perinuclear como em pontos dispersos pelo citoplasma. Acúmulos extracelulares de OPN eram evidentes apenas em culturas crescidas sobre as superfícies Plus+HA, P-15 low e P-15 high, os quais estavam associados a células OPN-positivas. Em 3 dias, esses acúmulos de OPN eram mais extensos do que em 1 dia (Figura 9A-K).

Em 7 e 10 dias, a localização de BSP era perinuclear e em pontos dispersos pelo citoplasma em áreas de maior densidade celular sobre todas as superfícies. Acúmulos extracelulares ocorriam ou não em associação a essas áreas. Qualitativamente, eram menos extensas as áreas imunomarcadas para BSP nos grupos Plus e Plus+HA, expressiva nesse último, sobretudo em 7 dias (Figura 9L-U). Em 10 dias, a marcação simultânea de BSP e OPN podia ser observada em células organizadas em áreas de multicamadas celulares nas culturas sobre a superfície

usinada (Figura 9Q). Em relação às demais superfícies, áreas BSP-positivas com discreta marcação para OPN eram observadas apenas para os grupos com P-15.

Figura 9. Epifluorescência de culturas osteogênicas crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti por períodos de 1 (A-E), 3 (F-K), 7 (L-P) e 10 (Q-U) dias. Marcação em vermelho indica OPN em A-K e BSP em L-U. Fluorescência verde revela citoesqueleto de actina em A-K e OPN em Q, enquanto que a azul, os núcleos celulares (A-U). Notam-se acúmulos extracelulares de OPN em C-E e I-K e extensas áreas BSP-positivas em T e U. A barra de escala indica 50 μ m para A-K,Q e 200 μ m para L-P,R-U.

3.8 Análise do grau de diferenciação osteoblástica por *Real time PCR*

As culturas crescidas sobre as superfícies Plus e Plus modificadas exibiram valores de RNAm menores para RUNX2 em 7 dias em comparação ao grupo Usinado, aumentando em 10 dias apenas para as Plus modificadas (ANOVA a dois fatores de variação, $p < 0,05$) (Figura 10; Tabelas 5 e 12).

Figura 10. Expressão do fator de transcrição RUNX2 em culturas primárias osteogênicas crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 7 e 10 dias. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo GAPDH, tendo sido atribuído o valor 1 para o grupo Usinado em 7 dias.

Tabela 5 – ANOVA a dois fatores (pós-teste de Tukey), referente à expressão de RUNX2 em 7 e 10 dias em culturas crescidas sobre as superfícies de Ti. Grupos e tempos estão indicados por números, de 1 a 10

1	7 dias - Usinado
2	7 dias - Plus
3	7 dias - Plus+HA
4	7 dias - P-15 low
5	7 dias - P-15 high
6	10 dias - Usinado
7	10 dias - Plus
8	10 dias - Plus+HA
9	10 dias - P-15 low
10	10 dias - P-15 high

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		*	*	*	*	*	*	*	*	*
2			*		*	*				*
3										
4			*		*					
5										
6										
7			*		*					
8										
9			*		*	*		*		*
10										

* $p < 0,05$

Os valores de RNAm para ALP foram significativamente maiores em 10 dias se comparados a 7 apenas para as culturas sobre as superfícies Plus e Plus modificadas; para o grupo Usinado, observou-se expressiva redução de 7 para 10 dias (ANOVA a dois fatores de variação, $p < 0,05$) (Figura 11; Tabelas 6 e 12).

Figura 11. Expressão de ALP em culturas primárias osteogênicas crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 7 e 10 dias. Normalização pelo gene GAPDH, atribuindo-se o valor 1 para o grupo Usinado em 7 dias.

Tabela 6 – ANOVA a dois fatores (pós-teste de Tukey), referente à expressão de ALP em 7 e 10 dias em culturas crescidas sobre as superfícies de Ti. Grupos e tempos estão indicados por números, de 1 a 10

1	7 dias - Usinado
2	7 dias - Plus
3	7 dias - Plus+HA
4	7 dias - P-15 low
5	7 dias - P-15 high
6	10 dias - Usinado
7	10 dias - Plus
8	10 dias - Plus+HA
9	10 dias - P-15 low
10	10 dias - P-15 high

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		*	*	*	*	*	*	*	*	*
2			*							
3										
4										
5										
6		*	*	*	*			*		
7		*	*	*	*			*		*
8		*	*	*	*					
9		*	*	*	*			*		
10		*	*	*	*					

* $p < 0,05$

Para BSP, observaram-se valores significativamente maiores de RNAm de 7 para 10 dias para todos os grupos, com os maiores valores para o grupo Usinado (ANOVA a dois fatores de variação, $p < 0,05$) (Figura 12; Tabelas 7 e 12).

Figura 12. Expressão de BSP em culturas primárias osteogênicas crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 7 e 10 dias. Normalização pelo gene GAPDH, atribuindo-se valor 1 para o grupo Usinado em 7 dias.

Tabela 7 – ANOVA a dois fatores (pós-teste de Tukey), referente à expressão de BSP em 7 e 10 dias em culturas sobre as superfícies de Ti. Grupos e tempos estão indicados por números, de 1 a 10

1	7 dias - Usinado
2	7 dias - Plus
3	7 dias - Plus+HA
4	7 dias - P-15 low
5	7 dias - P-15 high
6	10 dias - Usinado
7	10 dias - Plus
8	10 dias - Plus+HA
9	10 dias - P-15 low
10	10 dias - P-15 high

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		*	*	*	*			*	*	*
2										
3										
4										
5										
6	*	*	*	*	*		*	*	*	*
7		*	*	*	*			*	*	*
8		*	*	*	*					
9		*	*	*	*					
10		*	*	*	*					

* $p < 0,05$

Valores significativamente maiores de expressão de RNAm para OPN foram detectados em culturas crescidas sobre as superfícies Plus e Plus modificadas em 7 dias e, em 10 dias, naquelas sobre as superfícies Plus modificadas, com pico de expressão para P-15 low (ANOVA a dois fatores de variação, $p < 0,05$) (Figura 13; Tabelas 8 e 12).

Figura 13. Expressão de OPN em culturas primárias osteogênicas crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 7 e 10 dias. Normalização pelo gene GAPDH, atribuindo-se valor 1 para o grupo Usinado em 7 dias.

Tabela 8 – ANOVA a dois fatores (pós-teste de Tukey), referente à expressão de OPN em 7 e 10 dias em culturas crescidas sobre as superfícies de Ti. Grupos e tempos estão indicados por números, de 1 a 10

1	7 dias - Usinado
2	7 dias - Plus
3	7 dias - Plus+HA
4	7 dias - P-15 low
5	7 dias - P-15 high
6	10 dias - Usinado
7	10 dias - Plus
8	10 dias - Plus+HA
9	10 dias - P-15 low
10	10 dias - P-15 high

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2	*					*	*			
3	*	*				*	*			*
4	*	*				*	*			*
5	*	*				*	*			*
6										
7										
8	*	*				*	*			*
9	*	*	*	*	*	*	*	*		*
10	*					*	*			

* $p < 0,05$

3.9 Atividade de ALP

Em 10 dias, observou-se redução estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) na atividade de ALP em culturas sobre as superfícies Plus e Plus modificadas, se comparadas ao grupo Usinado (Figura 14; Tabelas 9 e 12). A funcionalização com P-15 não alterou os valores de atividade de ALP quando comparados aos obtidos para as superfícies Plus e Plus+HA.

Figura 14. Atividade de ALP (média $\pm$ desvio padrão, em μmol de timolftaleína/h/mg de proteína) em culturas osteogênicas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 10 dias. Valores menores são observados para as superfícies com microtopografia, se comparadas ao grupo Usinado.

Tabela 9 – Comparações múltiplas (Pós-teste de Fisher) da atividade de ALP de células osteogênicas crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 10 dias

Comparações	
Usinado x Plus	0,1%
Usinado x Plus+HA	5%
Usinado x P-15 low	1%
Usinado x P-15 high	5%
Plus x Plus+HA	NS
Plus x P-15 low	NS
Plus x P-15 high	NS
Plus+HA x P-15 low	NS
Plus+HA x P-15 high	NS
P-15 low x P-15 high	NS

NS: Não significativa

3.10 Ensaio para detecção de células em apoptose

Em 10 dias, a funcionalização com P-15 resultou na redução da proporção de células Anexina V+/IP-, em estágios iniciais de apoptose, e no aumento, da ordem de 2 vezes, da proporção de células Anexina V+/IP+, em estágios mais avançados de apoptose, em comparação aos controles Plus e Plus+HA (Figura 15; Tabela 10).

Figura 15. Análise por citometria de fluxo da proporção de células positivas para Anexina V e iodeto de propídeo (IP) de culturas osteogênicas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 10 dias. Para cada gráfico, quadrante superior esquerdo indica células em necrose (Anexina V-/IP+); quadrante inferior esquerdo, células viáveis (Anexina V-/IP-); quadrante superior direito, células em estágios avançados de apoptose (Anexina V+/IP+); quadrante inferior direito, células em estágios iniciais de apoptose (Anexina V+/IP-).

Tabela 10 – Porcentagem de células nos estágios iniciais de apoptose (Anexina V+/IP-) e em estágios mais avançados de apoptose (Anexina V+/IP+) de culturas osteogênicas sobre as superfícies de Ti, em 10 dias

Grupos	Anexina V+/IP-	Anexina V+/IP+
Usinado	65,3%	7,6%
Plus	79,9%	8,0%
Plus+HA	80,8%	10,9%
P-15 low	64,5%	19,2%
P-15 high	68,6%	19,6%

3.11 Formação de matriz mineralizada

Em 14 e 21 dias, a formação de matriz mineralizada nas culturas osteogênicas sobre as diferentes superfícies de Ti foi avaliada, qualitativa e quantitativamente, por coloração com ARS (Figuras 16 e 17; Tabelas 11 e 12). Formações nodulares típicas de matriz mineralizada, de cor castanho-avermelhada, ocorriam sobre a superfície plana de todos os espécimes do grupo Usinado em 14 e 21 dias. Para as superfícies Plus e Plus modificadas, essas formações eram raras em 14 dias e mais frequentes aos 21 dias, ainda que em menor quantidade do que no grupo Usinado. Além disso, áreas difusas, de coloração vermelha para a superfície usinada e castanho-avermelhada para as superfícies Plus e Plus modificadas, podiam ser observadas nos dois tempos experimentais (Figura 16A-K). Microscopicamente, em 14 dias observavam-se áreas de intensa fluorescência vermelha, de contorno irregular, imunomarcadas, em sua periferia, por BSP (fluorescência verde; Figura 16L-P). A marcação para BSP era mais evidente para as culturas do grupo Usinado (Figura 16L).

A análise quantitativa pela extração do ARS permitiu identificar valores estatisticamente maiores (ANOVA a dois fatores de variação, $p < 0,05$), em 14 e 21 dias, para as culturas osteogênicas sobre as superfícies Plus modificadas, em comparação com os grupos Plus e Usinado. Aumento estatisticamente significativo de 14 para 21 dias foi observado apenas para as culturas sobre a superfície P-15 low. Enquanto que em 14 dias não se observaram diferenças estatisticamente significantes entre as superfícies Plus modificadas, em 21 dias a mineralização era significativamente maior para P-15 low em comparação a P-15 high (Figura 17; Tabelas 11 e 12). A coloração com ARS das diferentes superfícies de Ti expostas ao meio de cultura osteogênico por 14 dias na ausência de células resultou em valores

de densidade óptica extremamente baixos, mesmo para as superfícies recobertas com HA (Figura 17; Tabela 11).

Figura 16. Aspectos macro (A-K) e microscópicos (L-U) de culturas osteogênicas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 14 e 21 dias, coradas com ARS (cores vermelha e castanha em A-K e fluorescência vermelha em L-U) e imunomarcadas com BSP (fluorescência verde em L-P). Em 14 dias, acúmulos de BSP estavam associados à periferia das formações nodulares de matriz mineralizada e eram mais evidentes para o grupo Usinado (L). Fluorescência azul em L-P indica núcleos celulares. Barra para A-K = 2,8 mm; L-N = 100 μ m; O,P = 200 μ m; Q-U = 800 μ m.

Figura 17. Quantificação de vermelho de Alizarina de superfícies sem células, mantidas em meio de cultura por 14 dias, e de culturas osteogênicas crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 14 e 21 dias. Notem-se valores maiores para os grupos Plus modificados.

Tabela 11 – ANOVA a dois fatores (pós-teste de Tukey), referente à quantificação do vermelho de Alizarina em 14 e 21 dias de culturas osteogênicas crescidas sobre as superfícies de Ti. Grupos e tempos estão indicados por números, de 1 a 10

1	14 dias - Usinado
2	14 dias - Plus
3	14 dias - Plus+HA
4	14 dias - P-15 low
5	14 dias - P-15 high
6	21 dias - Usinado
7	21 dias - Plus
8	21 dias - Plus+HA
9	21 dias - P-15 low
10	21 dias - P-15 high

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2										
3	*	*				*	*			
4	*									
5	*									
6										
7										
8	*	*				*	*			
9	*	*		*	*	*	*			*
10										

*p<0,05

Tabela 12 – Análises quantitativas de molhamento de superfície, adesão e espreadimento celular, viabilidade celular, proliferação, número total de células, expressão gênica, atividade de ALP e áreas marcadas com ARS de culturas osteogênicas crescidas sobre superfícies de titânio Usinado, Plus, Plus+HA, P-15 low e P-15 high

Parâmetros	Tempo	Usinado	Plus	Plus+HA	P-15 low	P-15 high	P
Molhamento de superfície	Inicial	81,10 ± 8,77	123,93 ± 4,71	141,67 ± 2,25	102,73 ± 9,10	120,87 ± 5,35	<0,05
	Equilíbrio	66,73 ± 9,69	114,37 ± 3,36	118,50 ± 5,90	38,37 ± 4,45	46,63 ± 30,26	<0,05
Adesão e espreadimento celular (Estágios 1 e 2; 3 e 4; %)	4 h	43,31 ± 9,40	71,75 ± 8,90	88,07 ± 8,86	87,27 ± 5,94	90,99 ± 4,21	<0,05
		56,68 ± 9,40	28,26 ± 8,90	11,92 ± 8,85	12,71 ± 5,94	9,00 ± 4,21	<0,05
	1 d	0,085 ± 0,017	0,086 ± 0,013	0,088 ± 0,010	0,103 ± 0,018	0,104 ± 0,022	NS
Viabilidade celular	3 d	0,124 ± 0,011	0,112 ± 0,010	0,140 ± 0,020	0,147 ± 0,006	0,132 ± 0,009	<0,05
	7 d	0,427 ± 0,025	0,318 ± 0,071	0,324 ± 0,056	0,333 ± 0,078	0,344 ± 0,123	NS
Proliferação (Ki-67; %)	3 d	91,15 ± 3,07	81,90 ± 8,65	87,58 ± 6,24	83,49 ± 5,01	89,57 ± 0,46	NS
Número total de células	7 d	18,50 ± 1,86	11,36 ± 2,87	10,60 ± 1,91	11,62 ± 2,38	13,00 ± 2,74	<0,01
	7 d	1,005 ± 0,127	0,505 ± 0,026	0,295 ± 0,013	0,454 ± 0,036	0,262 ± 0,031	<0,05
RNAm para RUNX2	10 d	0,376 ± 0,041	0,459 ± 0,041	0,390 ± 0,028	0,529 ± 0,056	0,371 ± 0,036	<0,05
RNAm para ALP	7 d	1,005 ± 0,113	0,171 ± 0,003	0,029 ± 0,012	0,075 ± 0,005	0,057 ± 0,008	<0,05
	10 d	0,540 ± 0,023	0,648 ± 0,019	0,400 ± 0,064	0,545 ± 0,033	0,474 ± 0,082	<0,05
RNAm para BSP	7 d	1,011 ± 0,165	0,117 ± 0,007	0,033 ± 0,001	0,050 ± 0,011	0,049 ± 0,006	<0,05
	10 d	2,817 ± 0,206	1,121 ± 0,141	0,368 ± 0,103	0,494 ± 0,065	0,515 ± 0,066	<0,05
RNAm para OPN	7 d	1,000 ± 0,034	6,057 ± 1,239	8,777 ± 0,719	8,107 ± 0,334	7,792 ± 0,631	<0,05
	10 d	1,385 ± 0,127	1,403 ± 0,191	7,934 ± 0,548	10,699 ± 1,130	5,745 ± 0,564	<0,05
Atividade de ALP	10 d	37,50 ± 14,27	11,91 ± 11,80	20,04 ± 13,03	16,06 ± 12,13	16,77 ± 6,68	<0,05
ARS	14 d	1,69 ± 0,24	2,09 ± 0,23	4,01 ± 0,53	3,02 ± 0,62	3,09 ± 0,55	<0,05
	21 d	1,93 ± 0,60	1,91 ± 0,28	3,76 ± 0,66	4,51 ± 0,99	2,95 ± 0,91	<0,05

NS: Não significante

DISCUSSÃO

---

4 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que as modificações da superfície Plus para a funcionalização com P-15 afetaram o desenvolvimento do fenótipo osteogênico *in vitro*. Observaram-se alterações significativas em parâmetros iniciais da progressão de culturas primárias osteogênicas, incluindo menor proporção de células espiadas em 4 h, maior acúmulo extracelular de OPN em 1 e 3 dias e maior viabilidade celular em 3 dias. Diferenças no perfil de expressão de RUNX2, ALP, BSP e OPN em 7 e 10 dias precederam a ocorrência de maior mineralização das culturas em 14 e 21 dias sobre as superfícies Plus+HA, P-15 low e P-15 high, quando comparadas aos controles Plus e Usinado. Em 21 dias, as culturas sobre P-15 low estavam mais mineralizadas do que aquelas sobre P-15 high, mas quantitativamente semelhantes ao controle Plus+HA.

Uma das estratégias que têm sido utilizadas para promover e aumentar a osteogênese de contato e a osseointegração de implantes é o desenvolvimento de novas topografias em diferentes escalas. De fato, efeitos biológicos sinérgicos têm sido observados nas associações de topografias em micro e submicroescalas (ZINGER et al., 2004; TAN; SALTZMAN, 2004; WIELAND et al., 2005). Nesse contexto, foi desenvolvida a superfície Plus (DENTISPLY Friadent), que apresenta aspectos microtopográficos associados a submicrotopografia adicional, os quais favorecem o desenvolvimento mais precoce de formações de matriz calcificada *in vitro* (SCHWARTZ FO et al., 2007). Em estudos em modelos experimentais *in vivo*, a superfície Plus apresentou alto grau de contato osso-implante (PARK et al., 2009), maior densidade óssea em sítios periodontalmente contaminados (NOVAES et al.,

2004) e alta taxa de sobrevivência e estabilidade de nível ósseo marginal a longo prazo (DEGIDI et al., 2006).

Apesar dos benefícios clínicos alcançados até o presente momento com o uso de implantes metálicos com microtopografias complexas, persistem os desafios para o desenvolvimento de novas superfícies que aumentem a previsibilidade do reparo ósseo em sítios de baixa densidade óssea e promovam sua estabilidade em longo prazo (LAMERS et al., 2010). Nos últimos anos, busca-se a criação de nanotopografias e sua funcionalização com moléculas bioativas, estratégia promissora que visa ao controle das interações iniciais de células, proteínas plasmáticas e da matriz extracelular com o substrato, as quais ocorrem em escala nanométrica (PULEO; NANJI, 1999; MORRA, 2006; DE OLIVEIRA et al., 2007; MENDONÇA et al., 2008; BEUTNER et al., 2010). No presente estudo, a disponibilização de P-15 sobre a superfície Plus foi precedida da deposição de camada de HA, de aspecto acicular de dimensões nanométricas, como observado em microscopia eletrônica de alta resolução. Culturas sobre Plus+HA apresentaram potencial osteogênico significativamente maior do que o de seu controle Plus. De fato, a comparação de substratos de diferentes topografias tem demonstrado resultados mais favoráveis para superfícies estruturadas na nanoescala, como o aumento da expressão de marcadores específicos da diferenciação osteoblástica (DE OLIVEIRA; NANJI, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2007; MENDONÇA et al., 2009; MENDONÇA et al., 2010; LAMERS et al., 2010) e a maior formação de matriz mineralizada *in vitro* (DE OLIVEIRA et al., 2007; LAMERS et al., 2010). Além disso, vários estudos têm apresentado os benefícios da nanoestruturação de superfícies de Ti com HA, como maior proliferação celular (CHEN et al., 2006), maior contato osso-

implante (YANG et al., 2009) e maior formação de tecido ósseo ao redor de implantes (MEIRELLES et al., 2008; YANG et al., 2010).

Aspectos das interações iniciais de células com os substratos sobre os quais estão aderidas são determinantes para sua viabilidade, diferenciação e, conseqüentemente, o desenvolvimento de fenótipos teciduais específicos na interface com biomateriais (VETRONE et al., 2009). No presente estudo, no tempo de 4 h pós-plaqueamento, as células sobre as superfícies Plus modificadas exibiam menor espreadimento, mantendo-se menos espreadas em 3 dias, como observado por microscopia de fluorescência e MEV. Apesar de a redução do espreadimento celular estar relacionada a estágios mais avançados de diferenciação osteoblástica (TOSATTI et al., 2004) e, conseqüentemente, a índices menores de proliferação, não se observaram, em 3 dias, diferenças estatisticamente significantes entre os grupos na proporção de células Ki-67 positivas, proliferativas, sendo ainda os valores de MTT, indicativos de viabilidade e proliferação, significativamente maiores para as Plus modificadas. A maior atividade osteoblástica nessas culturas poderia estar representada pelos extensos acúmulos extracelulares de OPN em 1 e 3 dias, os quais têm sido descritos sobre nanotopografias que estimulam a diferenciação osteogênica *in vitro* (DE OLIVEIRA; NANJI, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2007; VETRONE et al., 2009). No entanto, a possibilidade de esses acúmulos ocorrerem por uma adsorção maior da proteína a superfícies nanoestruturadas não deve ser descartada, sendo objeto de investigação atual de nosso grupo de pesquisa.

A análise da expressão de marcadores da diferenciação osteoblástica por PCR quantitativo foi realizada em 7 e 10 dias, respectivamente no final da fase proliferativa e na fase inicial do processo de mineralização da matriz extracelular de culturas primárias osteogênicas. Para as superfícies Plus e Plus modificadas, foram

observados valores de RNAm menores para RUNX2 em 7 dias, menores para BSP e maiores para OPN em 7 e 10 dias, quando comparados ao Usinado, além de valores crescentes para ALP de 7 para 10 dias, o que claramente diferia do perfil de expressão gênica das culturas sobre a superfície usinada, plana na microescala. Considerando a microtopografia da Plus como controle, as culturas sobre as superfícies Plus modificadas exibiram níveis maiores de OPN em 7 e 10 dias, e inalterados de RUNX2 e menores de ALP (com exceção para P-15 low) e BSP em 10 dias. Adicionalmente, a comparação entre as superfícies Plus modificadas permitiu identificar, para P-15 low, valores maiores de RUNX2 em 7 e 10 dias e de OPN em 10 dias, mantendo-se inalterada a expressão de BSP nos dois tempos. Embora pudesse se esperar uma expressão maior e mais precoce dos marcadores de diferenciação osteoblástica para as culturas crescidas sobre as superfícies funcionalizadas, como observado para recobrimentos colágeno I (LYNCH et al., 1995), a interação das células osteogênicas com uma área superficial maior característica das superfícies Plus possivelmente atrasaria a confluência das culturas, resultando em menores níveis de expressão de RNAm para RUNX2, BSP e ALP em 7 dias. Essa interpretação é apoiada pelos resultados obtidos por Rosa et al. (2009), os quais demonstraram atraso para os picos de expressão de RUNX2 e ALP em células osteoblásticas crescidas sobre estrutura 3D de Ti poroso, na comparação com superfície plana de Ti denso, o que precedia um maior grau de mineralização da matriz extracelular nessas culturas.

No presente estudo, as diferenças no perfil de expressão de RUNX2, ALP, BSP e OPN resultaram na maior mineralização das culturas sobre Plus+HA, P-15 low e P-15 high, em padrão predominantemente difuso, com atraso da formação de nódulos mineralizados tipicamente observados sobre substratos planos na

microescala. A ocorrência concomitante de padrão distinto de mineralização seria mediada por células osteoblásticas cuja diferenciação terminal não dependeria da formação de multicamadas celulares. Ao menos em parte, esse fenômeno pode ser atribuído à interação das células osteogênicas com a microtopografia, uma vez que sobre a Plus os nódulos de mineralização eram visivelmente menores e menos freqüentes do que aqueles sobre a superfície usinada, tanto em 14 como em 21 dias. Para as Plus modificadas, esses nódulos eram raros em 14 dias e facilmente identificáveis em 21, apesar dos valores significativamente maiores de ARS em ambos os tempos, indicando a predominância de mineralização difusa e a necessidade de maior tempo para o desenvolvimento de nódulos mineralizados sobre essas superfícies.

Apesar de as principais diferenças no processo de desenvolvimento do fenótipo osteogênico terem sido detectadas entre as superfícies Plus modificadas e seus respectivos controles, observaram-se também diferenças significativas entre as culturas primárias sobre as superfícies Plus modificadas, sobretudo em relação ao seu potencial osteogênico. Em 21 dias, culturas sobre P-15 low exibiram maior grau de mineralização se comparadas àquelas sobre P-15 high, o que estava associado à maior expressão de RUNX2 e OPN para P-15 low durante o início da fase de diferenciação osteoblástica. Esses resultados apontam para a relevância de se avaliarem os efeitos biológicos da funcionalização de superfícies de implantes com diferentes concentrações de peptídeos, as quais podem afetar o padrão de resposta celular e tecidual na região interfacial. De fato, Lutz et al. (2010) observaram, em estudo *in vivo*, que superfícies de Ti com recobrimento de HA e funcionalizadas com 200 µg/mL de P-15 exibiam maior área de contato osso-implante se comparadas àquelas com menor concentração do peptídeo (20 µg/mL). Além disso, considerando

o atraso no desenvolvimento de nódulos mineralizados, mesmo que provavelmente decorrente da interação das células osteogênicas com os aspectos microtopográficos, seria importante desenvolver estratégia visando a disponibilização simultânea de outro(s) peptídeo(s) e/ou proteína(s) que poderiam atuar sinergicamente (discutido em DE OLIVEIRA et al., 2008), potencializando os efeitos biológicos do P-15.

Modificações topográficas e químicas dos biomateriais podem alterar a energia de superfície e, conseqüentemente, seu molhamento (MENDONÇA et al., 2008), com efeitos biológicos relevantes. Por exemplo, a nanoestruturação de superfície de Ti por condicionamento com H_2SO_4 e H_2O_2 reduz significativamente os ângulos de contato estático inicial e em equilíbrio, indicando a natureza hidrofílica de superfície que favorece a formação de matriz mineralizada *in vitro* (DE OLIVEIRA et al., 2007). Em modelos *in vivo*, a aceleração do processo de osseointegração pode ser obtida a partir da modificação química da superfície de Ti SLA (Straumann) para *SLAactive* (originalmente *modSLA*; Straumann), alterando-a de hidrofóbica para altamente hidrofílica (BUSER et al., 2004; ZHAO et al., 2005; RUPP et al., 2006). No presente estudo, a funcionalização de Plus+HA com P-15 em suas duas concentrações resultou em redução significativa do ângulo de contato em equilíbrio, tornando as superfícies P-15 low e P-15 high moderadamente hidrofílicas, o que poderia ser interpretado como uma vantagem adicional sobre as demais superfícies. No entanto, isso deve ser mais profundamente estudado, uma vez que as diferenças no potencial osteogênico *in vitro* sobre essas superfícies não poderiam ser explicadas por esse parâmetro, já que exibiram valores semelhantes de ângulo de contato em equilíbrio.

CONCLUSÃO

---

5 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que superfícies de Ti com microtopografia nanoestruturada com HA para funcionalização de P-15 alteram o processo de aquisição do fenótipo osteogênico *in vitro*. Culturas primárias sobre superfícies Plus modificadas exibiram modificações no perfil de expressão de marcadores osteoblásticos, resultando no aumento significativo de mineralização da matriz extracelular, em padrão difuso que diferia das típicas formações nodulares mineralizadas observadas sobre substratos planos na microescala. Na comparação entre as superfícies funcionalizadas com P-15, maior potencial osteogênico foi observado para as culturas sobre P-15 low.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamson AW, Gast AP. *Physical Chemistry of Surfaces*. 6ed. Nova York: John Wiley & Sons; 1997. The solid-liquid interface-contact angle, 347-389.

Auernheimer J, Zukowski D, Dahmen C, Kantlehner M, Enderle A, Goodman SL, Kessler H. Titanium implant materials with improved biocompatibility through coating with phosphonate-anchored cyclic RGD peptides. *Chembiochem* 2005;6:2034-2040.

Barboza EP, de Souza RO, Caula AL, Neto LG, Caula FD, Duarte MEL. Bone regeneration of localized chronic alveolar defects utilizing cell binding peptide associated with anorganic bovine-derived bone mineral: A clinical and histological study. *J Periodontol* 2002;73:1153-1159.

Barros RRM, Novaes AB, Roriz VM, de Oliveira RR, Grisi MFM, Souza SLS, Taba M, Palioto DB. Anorganic bovine matrix/P-15 "flow" in the treatment of periodontal defects: Case series with 12 months of follow-up. *J Periodontol* 2006;77:1280-1287.

Beutner R, Michael J, Schwenzer B, Scharnweber D. Biological nano-functionalization of titanium-based biomaterial surfaces: a flexible toolbox. *J R Soc Interface* 2010;7:S93-S105.

Bhatnagar RS, Qian JJ, Gough CA. The role in cell binding of a b-bend within the triple helical region in collagen $\alpha 1$ (I) chain: structural and biological evidence for conformational tautomerism on fiber surface. *J Biomol Struct Dyn* 1997;14:547-560.

Bhatnagar RS, Qian JJ, Wedrychowska A, Sadeghi M, Wu YM, Smith N. Design of biomimetic habitats for tissue engineering with P-15, a synthetic peptide analogue of collagen. *Tissue Eng* 1999;5:53-65.

Boyan BD, Lossdorfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann CH, Cochran DL, Schwartz Z. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur Cell Mater* 2003;6:22-27.

Brunski JB, Puleo DA, Nanci A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:15-46.

Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann SG. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 2004;83:529-533.

Chen F, Lam WM, Lin CJ, Qiu GX, Wu ZH, Luk KD, Lu WW. Biocompatibility of electrophoretical deposition of nanostructured hydroxyapatite coating on roughen titanium surface: in vitro evaluation using mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;82:183-191.

Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 1998;11:391-401.

De Assis AF, Beloti MM, Crippa GE, de Oliveira PT, Morra M, Rosa AL. Development of the osteoblastic phenotype in human alveolar bone-derived cells grown on a collagen type I-coated titanium surface. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:240-246.

Degidi M, Piattelli M, Scarano A, Iezzi G, Piattelli A. Maxillary sinus augmentation with a synthetic cell-binding peptide: histological and histomorphometrical results in humans. *J Oral Implantol* 2004;30:376-383.

Degidi M, Piattelli A, Carinci F. Parallel screw cylinder implants: comparative analysis between immediate loading and two-stage healing of 1,005 dental implants with a 2-year follow up. *Clin Implant Dent Relat Res* 2006;8:151-160.

De Oliva MA, Maximiano WM, de Castro LM, da Silva PE Jr, Fernandes RR, Ciancaglini P, Beloti MM, Nanci A, Rosa AL, de Oliveira PT. Treatment with a growth factor-protein mixture inhibits formation of mineralized nodules in osteogenic cell cultures grown on titanium. *J Histochem Cytochem* 2009;57:265-276.

De Oliveira PT, Zalzal SF, Irie K, Nanci A. (2003) Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. *J Histochem Cytochem* 2003;51:633-641.

De Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 2004;25:403-413.

De Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A* 2007;80:554-564.

De Oliveira PT, de Oliva MA, Maximiano WM, Sebastião KE, Crippa GE, Ciancaglini P, Beloti MM, Nanci A, Rosa AL. Effects of a mixture of growth factors and proteins

on the development of the osteogenic phenotype in human alveolar bone cell cultures. *J Histochem Cytochem* 2008; 56:629-638.

Di Iorio D, Traini T, Degidi M, Caputi S, Neugebauer J, Piattelli A. Quantitative evaluation of the fibrin clot extension on different implant surfaces: an in vitro study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;74:636-642.

Elmengaard B, Bechtold JE, Soballe K. In vivo effects of RGD-coated titanium implants inserted in two bone-gap models. *J Biomed Mater Res A* 2005;75:249-255.

Eto AL, Joly JC, Jeffcoat M, de Araújo NS, de Araújo VC, Cury PR. Use of anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix/cell-binding peptide (P-15) in the treatment of class II furcation defects: a clinical and radiographic study in humans. *J Periodontol* 2007;78:2277-2283.

García AJ, Reyes CD. Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation. *J Dent Res* 2005;84:407-413.

Geissler U, Hempel U, Wolf C, Scharnweber D, Worch H, Wenzel KW. Collagen type I coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 2000;51:752-760.

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* 2004;329:77-84.

Hanks T, Atkinson BL. Comparison of cell viability on anorganic bone matrix with or without P-15 cell binding peptide. *Biomaterials* 2004;25:4831-4836.

Healy KE, Rezania A, Stile RA. Designing biomaterials to direct biological responses. *Ann N Y Acad Sci* 1999;875:24-35.

Irie K, Zalzal S, Ozawa H, McKee MD, Nanci A. Morphological and immunocytochemical characterization of primary osteogenic cell cultures derived from fetal rat cranial tissue. *Anat Rec* 1998;252:554-567.

Jaffin RA, Berman CL. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: A 5-year analysis. *J Periodontol* 1991;62:2-4.

Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996;7:329-345.

Krauser JT, Rohrer MD, Wallace SS. Human histologic and histomorphometric analysis comparing OsteoGraf/N with PepGen P-15 in the maxillary sinus elevation procedure: a case report. *Implant Dent* 2000;9:298-302.

Lallier TE, Yukna R, Marie SS, Moses R. The putative collagen binding peptide hastens periodontal ligament cell attachment to bone replacement graft materials. *J Periodontol* 2001;72:990-997.

Lamers E, Walboomers XF, Domanski M, te Riet J, van Delft FC, Luttge R, Winnubst LA, Gardeniers HJ, Jansen JA. The influence of nanoscale grooved substrates on osteoblast behavior and extracellular matrix deposition. *Biomaterials* 2010;31:3307-3316.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))}. *Methods* 2001;25:402-408.

Lossdorfer S, Schwartz Z, Wang L, Lohmann CH, Turner JD, Wieland M, Cochran DL, Boyan BD. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *J Biomed Mater Res A* 2004;3:361-369.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.

Lutz R, Srour S, Nonnhoff J, Weisel, T, Damien CJ, Schlegel KA. Biofunctionalization of titanium implants with a biomimetic active peptide (P-15) promotes early osseointegration. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:726-734.

Lynch MP, Stein JL, Stein GS, Lian JB. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res* 1995;216:35-45.

Matsuzaka K, Walboomers XF, Yoshinari M, Inoue T, Jansen JA. The attachment and growth behavior of osteoblast-like cells on microtextured surfaces. *Biomaterials* 2003;24:2711-2719.

Meirelles L, Arvidsson A, Andersson M, Kjellin P, Albrektsson T, Wennerberg A. Nano hydroxyapatite structures influence early bone formation. *J Biomed Mater Res A* 2008;87:299-307.

Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials* 2008;29:3822-3835.

Mendonça G, Mendonça DB, Simões LG, Araújo AL, Leite ER, Duarte WR, Aragão FJ, Cooper LF. The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. *Biomaterials* 2009;30:4053-4062.

Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. The combination of micron and nanotopography by H(2)SO(4)/H(2)O(2) treatment and its effects on osteoblast-specific gene expression of hMSCs. *J Biomed Mater Res A* 2010;94:169-179.

Moffatt P, Gaumond MH, Salois P, Sellin K, Bessette MC, Godin E, de Oliveira PT, Atkins GJ, Nanci A, Thomas G. Bril: a novel bone-specific modulator of mineralization. *J Bone Miner Res* 2008;23:1497-1508.

Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Cahalan P, Cahalan L, Fini M, Giardino R. Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies. *Biomaterials* 2003;24:4639-4654.

Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Mazzucco L, Borzini P, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Collagen I-coated titanium surfaces: mesenchymal cell adhesion and in vivo evaluation in trabecular bone implants. *J Biomed Mater Res A* 2006;78:449-458.

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

Nanci A, Zalzal S, Gotoh Y, McKee MD. Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microsc Res Tech* 1996;33:214-231.

Neiva RF, Tsao Y, Eber R, Shotwell J, Billy E, Wang H. Effects of a putty-form hydroxyapatite matrix combined with the synthetic cell-binding peptide P-15 on alveolar ridge preservation. *J Periodontol* 2008;79:291-299.

Nguyen H, Qian JJ, Bhatnagar RS, Li S. Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:179-186.

Novaes AB Jr, Papalexiou V, Grisi MF, Souza SS, Taba M Jr, Kajiwarra JK. Influence of implant microstructure on the osseointegration of immediate implants placed in periodontally infected sites. A histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:34-43.

Park JY, Davies JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2000;11:530-539.

Park JY, Gemmell CH, Davies JE. Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials* 2001;22:2671-2682.

Park JW, Kim HK, Kim YJ, An CH, Hanawa T. Enhanced osteoconductivity of micro-structured titanium implants (XiVE S CELLplus) by addition of surface calcium chemistry: a histomorphometric study in the rabbit femur. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:684-690.

Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999;20:2311-2321.

Qian JJ, Bhatnagar RS. Enhanced cell attachment to anorganic bone mineral in the presence of a synthetic peptide related to collagen. *J Biomed Mater Res* 1996;31:545-554.

Rajaraman R, Rounds DE, Yen SP, Rembaum A. A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. *Exp Cell Res* 1974;88:327-39.

Rammelt S, Schulze E, Bernhardt R, Hanisch U, Scharnweber D, Worch H, Zwipp H, Biewener A. Coating of titanium implants with type-I collagen. *J Orthop Res* 2004;22:1025-1034.

Rezania A, Johnson R, Lefkow AR, Healy KE. Bioactivation of metal oxide surfaces. 1. Surface characterization and cell response. *Langmuir* 1999;15:6931-6939.

Rosa AL, Crippa GE, de Oliveira PT, Taba M Jr, Lefebvre LP, Beloti MM. Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:472-481.

Rosei F. Nanostructured surfaces: challenges and frontiers in nanotechnology. *J Phys Condens Matter* 2004;16:1373-1436.

Rupp F, Scheideler L, Olshanska N, de Wild M, Wieland M, Geis-Gerstorfer J. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2006;76:323-334.

Schliephake H, Scharnweber D, Dard M, Rossler S, Sewing A, Meyer J, Hoogestraat D. Effect of RGD peptide coating of titanium implants on periimplant bone formation in the alveolar crest. An experimental pilot study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:312-319.

Schliephake H, Scharnweber D, Dard M, Sewing A, Aref A, Roessler S. Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;73:88-96.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182:311-322.

Schwartz Fo HO, Novaes AB Jr, de Castro LMS, Rosa AL, de Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res* 2007;18:333-344.

Senyah N, Hildebrand G, Liefelth K. Comparison between RGD-peptide-modified titanium and borosilicate surfaces. *Anal Bioanal Chem* 2005;383:758-762.

Smiler DG. Comparison of anorganic bovine mineral with and without synthetic peptide in a sinus elevation: a case study. *Implant Dent* 2001;10:139-142.

Sodek J, McKee M. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000 2000;24:99-126.

Suaid FA, Macedo GO, Novaes AB, Borges GJ, Souza SL, Taba M, Palioto DB, Grisi MF. The bone formation capabilities of the anorganic bone matrix-synthetic cell-binding peptide 15 grafts in an animal periodontal model: a histologic and histomorphometric study in dogs. *J Periodontol* 2010;81:594-603.

Tan J, Saltzman WM. Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure. *Biomaterials* 2004;25:3593-3601.

Tosatti S, Schwartz Z, Campbell C, Cochran DL, VandeVondele S, Hubbell JA, Denzer A, Simpson J, Wieland M, Lohmann CH, Textor M, Boyan BD. RGD-containing peptide GCRGYGRGDSPG reduces enhancement of osteoblast differentiation by poly(L-lysine)-graft-poly(ethylene glycol)-coated titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2004;68:458-472.

Vetrone F, Variola F, Tambasco de Oliveira P, Zalzal SF, Yi JH, Sam J, Bombonato-Prado KF, Sarkissian A, Perepichka DF, Wuest JD, Rosei F, Nanci A. Nanoscale oxidative patterning of metallic surfaces to modulate cell activity and fate. *Nano Lett* 2009;9:659-665.

Wieland M, Textor M, Chehroudi B, Brunette DM. Synergistic interaction of topographic features in the production of bone-like nodules on Ti surfaces by rat osteoblasts. *Biomaterials* 2005;26:1119-1130.

Xiao SJ, Textor M, Spencer ND, Wieland M, Keller B, Sigrist H. Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *J Mater Sci Mater Med* 1997;8:867-872.

Xiao SJ, Textor M, Spencer ND, Sigrist H. Covalent attachment of cell-adhesive, (Arg-Gly-Asp)-containing peptides to titanium surfaces. *Langmuir* 1998;14:5507-5516.

Yang GL, He FM, Hu JA, Wang XX, Zhao SF. Effects of biomimetically and electrochemically deposited nano-hydroxyapatite coatings on osseointegration of porous titanium implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:782-789.

Yang GL, He FM, Hu JA, Wang XX, Zhao SF. Biomechanical comparison of biomimetically and electrochemically deposited hydroxyapatite-coated porous titanium implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:420-427.

Yukna RA, Callan DP, Krauser JT, Evans GH, Aichelmann-Reidy ME, Moore K, Cruz R, Scott JB. Multi-center clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. 6-month results. *J Periodontol* 1998;69:655-663.

Yukna RA, Krauser JT, Callan DP, Evans GH, Cruz R, Martin M. Multi-center clinical comparison of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) and ABM in human periodontal osseous defects. 6-month results. *J Periodontol*. 2000;71:1671-1679.

Yukna RA, Krauser JT, Callan DP, Evans GH, Cruz R, Martin M. Thirty-six month follow-up of 25 patients treated with combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell-binding peptide (P-15) bone replacement grafts in human infrabony defects. I. Clinical findings. *J Periodontol* 2002;73:123-128.

Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan БВ. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 2005;74:49-58.

Zinger O, Anselme K, Denzer A, Habersetzer P, Wieland M, Jeanfils J, Hardouin P, Landolt D. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials* 2004;25:2695-2711.