**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA
BUCO-MAXILO-FACIAL**

**Funcionalização de GDF-5 em superfície
nanoestruturada de titânio: estudos *in vitro* e *in vivo***

Renan de Barros e Lima Bueno

Ribeirão Preto

2015

Renan de Barros e Lima Bueno

**Funcionalização de GDF-5 em superfície nanoestruturada
de titânio: estudos *in vitro* e *in vivo***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Paulo Tambasco de Oliveira

Ribeirão Preto

2015

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

Bueno, Renan de Barros e Lima

Funcionalização de GDF-5 em superfície nanoestruturada de titânio: estudos *in vitro* e *in vivo*. Ribeirão Preto, 2015.

95p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: De Oliveira, Paulo Tambasco.

1. Titânio. 2. Nanotopografia. 3. Osteogênese. 4. Fator de crescimento. 5. Cultura de células. 6. Funcionalização de superfície.

**Trabalho realizado nos laboratórios de Cultura de Células e de
Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, com recursos da Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2011/50342-0 e 2012/21330-6).**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Renan de Barros e Lima Bueno

Funcionalização de GDF-5 em superfície nanoestruturada de titânio: estudos *in vitro* e *in vivo*.

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

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia
Buco-Maxilo-Facial

Aprovado em: ____ / ____ / 2015

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, João Batista e Eline. Grande parte desta conquista devo a vocês. Serei eternamente grato.

Aos meus irmãos Marcel e Rafaela. Sem vocês a vida seria menos divertida.

À minha noiva Ana Paula, pelo apoio, compreensão e carinho em todos esses anos.

Amo você!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, representada pelo diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de doutorado (2011/50342-0) e pelo auxílio à pesquisa (2012/21330-6) concedidos.

Ao Prof. Dr. Cássio Edvard Sverzut, pela co-orientação, Adalberto Luiz Rosa, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Júnior, do Grupo de Polímeros Bernhard Gross, IFSC-USP e ao Prof. Dr. Antonio Nanci, do Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials (Université de Montréal), pela colaboração neste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, grande pessoa, orientador e amigo. Fiquei muito honrado em ter trabalhado todos esses anos com uma pessoa honesta e de caráter. Você me ensinou muito, mestre!

Aos docentes do curso de Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, Prof. Dr. Alexandre Elias Trivellato, Prof. Dr. Cássio Edvard Sverzut, Prof. Dr. Luiz Antônio Salata, Prof. Dr. Samuel Porfírio Xavier, Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros, pelo grande aprendizado e pela boa convivência.

Aos amigos Larissa de Castro e Lucas Novaes. Pessoas que me ajudaram muito no Laboratório de Cultura de Células. Muito obrigado pela paciência e bondade, sem vocês ficaria muito mais difícil meu trabalho.

Ao Roger Rodrigo Fernandes, pela grande ajuda durante os experimentos no laboratório.

À Fabíola Singaretti de Oliveira e Milla Sprone Tavares Ricoldi, pela orientação e ajuda na realização dos experimentos no Laboratório de Biologia Molecular.

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da FORP-USP, Dulce Negretti e Tatiana Fernandes.

Ao pessoal do biotério, pela ajuda e atenção nos experimentos in vivo.

À Adriana Luisa Gonçalves de Almeida e Sebastião Carlos Bianco, pelo trabalho ágil e competente no processamento das peças histológicas.

Ao Andrey Coatrini Soares e Felipe José Pavinatto, do Grupo de Polímeros Bernhard Gross, IFSC-USP, pelos grandes ensinamentos na fabricação dos filmes layer by layer.

Aos demais funcionários e amigos da FORP-USP, que em algum momento me ajudaram na realização desse trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ti: titânio

LbL: layer by layer

GDF-5: fator de crescimento e diferenciação 5

ALP: fosfatase alcalina

MEC: matriz extracelular

PLGA: poli ácido láctico-co-glicólico

µm: micrometro

nm: nanometro

H₂SO₄: ácido sulfúrico

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

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

TA: temperatura ambiente

TGF-β: fator de crescimento transformante β

BMPs: proteínas ósseas morfogenéticas

PAH: hidrocloreto de polialilamina

UV-Vis: ultravioleta-visível

CEUA: comissão de ética no uso de animais

α-MEM: meio essencial mínimo, modificação α

MEC: matriz extracelular

ng/mL: nanograma/mililitro

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

OPN: osteopontina

BSP: sialoproteína óssea

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

OC: osteocalcina

HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

ARS: vermelho de Alizarina

BIC: bone-to-implant contact

BABT: bone area between threads

BAMA: bone area within the mirror area

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

mm: milímetro

kV: kilovolt

°C: grau Celsius

mM: milimolar

µg/mL: micrograma/mililitro

CO₂: gás carbônico

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

DNA: ácido desoxirribonucleico

h: hora

M: molar

mg/mL: miligrama/mililitro

mL: mililitro

µL: microlitro

min: minuto

PB: solução tampão fosfato (*Phosphate buffered*)

nM: nanomolar

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

s: segundo

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

MAP: Mitogen Activated Protein

RESUMO

RESUMO

Estudo anterior de nosso grupo demonstrou que superfície de titânio (Ti) com nanotopografia obtida por condicionamento com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ e funcionalizada com GDF-5 por simples adsorção promove o aumento da mineralização de culturas primárias de células osteogênicas. O presente estudo teve como objetivos avaliar: 1) os efeitos da pós-adsorção de proteínas principais do plasma- albumina, fibrinogênio e fibronectina, em superfícies de Ti controle e com nanotopografia, funcionalizadas com GDF-5 a 200 ng/mL por simples adsorção, sobre a formação de matriz mineralizada *in vitro*; 2) parâmetros moleculares e fenotípicos característicos da aquisição do fenótipo osteogênico *in vitro* sobre superfícies de Ti funcionalizadas com GDF-5 por simples adsorção ou por filmes LbL; 3) parâmetros de formação óssea adjacente a implantes de Ti com nanotopografia funcionalizada com GDF-5 pelos dois métodos, em modelo de tibia de coelhos. Os resultados mostraram que a pós-adsorção de proteínas plasmáticas não afetou o potencial osteogênico *in vitro*, com exceção para o efeito inibidor da albumina, quando pós-adsorvida isoladamente. Tanto a superfície de Ti como o método de funcionalização de GDF-5 afetaram, quantitativamente, as formações de matriz mineralizada, com a maior diferenciação osteogênica para Ti com nanotopografia funcionalizada com GDF-5 por simples adsorção e a menor, para os filmes LbL, independentemente das superfícies sobre as quais eles eram montados. A atividade de ALP foi maior em culturas sobre nanotopografia de Ti, incluindo aquelas funcionalizadas com GDF-5, cujos valores, no entanto, não corresponderam, necessariamente, à maior atividade osteogênica. Apesar disso, todos os grupos exibiram expressão de marcadores de diferenciação osteoblástica, com sobre-expressão de osteopontina e osteocalcina para culturas sobre LbL. As análises microtomográfica, histológica e histomorfométrica não revelaram diferenças qualitativas e quantitativas *in vivo* entre nanotopografias de Ti funcionalizadas ou não com GDF-5, ainda que uma tendência à maior formação óssea tenha sido observada para as superfícies funcionalizadas e, entre essas, para os filmes LbL. Considerados conjuntamente, os resultados do presente estudo contribuem para o melhor entendimento das respostas de osteoblastos e do tecido ósseo quando se propõe a estratégia de funcionalização de superfícies de Ti com GDF-5 visando à otimização da osseointegração.

ABSTRACT

It has been demonstrated that a nanostructured titanium (Ti) surface obtained by treatment with $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ and functionalized with GDF-5 by simple adsorption promotes the enhancement of mineralized matrix formation in osteogenic cell cultures. This study aimed to evaluate: 1) the effects of post-adsorption of major plasma proteins, i.e. albumin, fibrinogen and fibronectin, on control and nanostructured Ti surfaces, functionalized with 200 ng/mL GDF-5 by simple adsorption, on mineralized matrix formation by calvarial osteogenic cell cultures; 2) molecular and phenotypic parameters characteristics of the acquisition of the osteogenic phenotype *in vitro* on Ti surfaces functionalized with GDF-5 by either simple adsorption or layer by layer (LbL) films; 3) parameters of bone formation adjacent to Ti implants with a nanostructured surface functionalized with GDF-5 by the two methods described in item 2, in a rabbit tibia model. The results showed that the post-adsorption of plasma proteins did not affect the osteogenic potential of cultures, except for the inhibitory effect of albumin when post-adsorbed alone. Either the Ti surface topography or the method for GDF-5 functionalization quantitatively affected mineralized matrix formation, with the higher osteogenic differentiation for nanostructured Ti functionalized with GDF-5 by simple adsorption and the lower one for LbL films, irrespective of the Ti surface topography on which they were mounted. ALP activity was higher for cultures grown on nanostructured Ti, including those functionalized with GDF-5, whose values, however, did not necessarily correspond to the higher osteogenic activity. Despite that, all groups expressed osteoblast differentiation markers, with a remarkable increase in osteopontin and osteocalcin mRNA levels for cultures grown on LbL films. The microtomographic, histologic and histomorphometric analyses revealed no qualitative or quantitative differences *in vivo* among the nanostructured Ti implants, yet a tendency for enhanced bone formation was observed for the functionalized surfaces and, between them, for the LbL films. Taken together, the results of the present *in vitro* and *in vivo* studies contribute to a better understanding of osteoblast and bone tissue responses to the functionalization of Ti surfaces with GDF-5 aiming to optimize osseointegration.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
RESUMO.....	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	19
2 PROPOSIÇÃO	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Caracterização das superfícies de Ti.....	29
3.2 Adsorção de GDF-5	29
3.3 Pós-adsorção de proteínas plasmáticas	30
3.4 Obtenção dos filmes pelo método LbL.....	30
3.5 Ângulo de contato (Molhamento) e energia livre de superfície.....	31
3.6 Isolamento celular e culturas de células osteogênicas	31
3.7 Atividade de ALP.....	32
3.8 Imunolocalização de ALP.....	32
3.9 Análise do grau de diferenciação osteoblástica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (<i>Real-time</i> PCR).....	34
3.10 Detecção de acúmulos de cálcio (formação de matriz mineralizada).....	35
3.11 Implantes de Ti e funcionalização de GDF-5	36
3.12 Animais e procedimento cirúrgico	37
3.13 Análise microtomográfica	38
3.14 Processamento histológico e análises histológica e histomorfométrica	40
3.15 Análise estatística	41
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Subprojeto 1	43
4.2 Subprojeto 2	51
4.3 Subprojeto 3	66
5 DISCUSSÃO	74
6 CONCLUSÃO.....	82
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Em Implantologia, novas estratégias para modificação da superfície de implantes metálicos têm sido propostas com o objetivo de aumentar e/ou acelerar a atividade osteogênica em sítios de baixa densidade óssea e para carga imediata (MOY et al. 2005; BORNSTEIN et al. 2009; BEUTNER et al. 2010), o que contribui com o desenvolvimento de uma nova geração de implantes osseointegráveis. Entre essas estratégias destacam-se as modificações topográficas na nanoescala e as modificações bioquímicas, com a disponibilização de moléculas bioativas (funcionalização de superfície), sendo a associação de ambas também explorada (MORRA et al. 2007; JUNKER et al. 2009; SHEKARAN & GARCIA 2011; BEUTNER et al. 2010).

Com o advento da Nanotecnologia, desenvolvem-se diferentes métodos para a criação de nanotopografias, visando ao controle das atividades celulares e da formação tecidual em contato com biomateriais (MENDONÇA et al. 2008; RICHERT et al. 2008; VARIOLA et al. 2009; VETRONE et al. 2009; VARIOLA et al. 2011). Com efeito, aspectos nanotopográficos de superfície afetam seletivamente as funções de diferentes tipos celulares e estágios de diferenciação, com consequente impacto no desenvolvimento do fenótipo tecidual (LORD et al. 2010). Em relação à resposta de células do tecido ósseo e da medula óssea, com sua característica heterogeneidade fenotípica, superfícies metálicas nanomodificadas favorecem a expansão de células tronco e seu comprometimento com a diferenciação osteoblástica, estimuladas pelas vias de sinalização celular mediadas por integrinas e BMPs (VETRONE et al. 2009; ROSA et al. 2014), resultando em maior expressão de RUNX2, ALP e BSP

(MENDONÇA et al. 2009; MENDONÇA et al. 2010). Além disso, nanotopografias estimulam os processos de adesão (WEBSTER et al. 2001; WEBSTER et al. 2004; KHANG et al. 2008; PUCKETT et al. 2008; YANG et al. 2009), espraçamento (LE GUEHENNEC et al. 2008; VETRONE et al. 2009), proliferação (VETRONE et al. 2009; YANG et al. 2009) e função de osteoblastos (ELIAS et al. 2002; PRICE et al. 2003; DE OLIVEIRA & NANJI 2004; DE OLIVEIRA et al. 2007; LE GUEHENNEC et al. 2008; YAO et al. 2008; YANG et al. 2009; VETRONE et al. 2009), enquanto que inibem o crescimento de fibroblastos (PRICE et al. 2004; RICHERT et al. 2008; VETRONE et al. 2009). Todos esses aspectos contribuem para a maior produção de matriz mineralizada sobre nanotopografia de Ti, como demonstrado em estudos *in vitro* (DE OLIVEIRA et al. 2007) e *in vivo* (MEIRELLES et al. 2007; MEIRELLES et al. 2008; WAZEN et al. 2013; GOLDMAN et al. 2014). Os efeitos da nanotopografia sobre as células podem ser diretos e/ou indiretos, respectivamente atribuídos aos aspectos geométricos na nanoescala e/ou ao impacto que essas nanomodificações exercem sobre o fenômeno de adsorção de proteínas, incluindo as plasmáticas e as da MEC (HOVGAARD et al. 2008; LORD et al. 2010; RICHERT et al. 2010).

A modificação bioquímica de superfícies de biomateriais visa à disponibilização de moléculas com efeitos estimuladores do reparo tecidual (BEUTNER et al. 2010), incluindo: 1) componentes principais da MEC do tecido ósseo, entre os quais hidroxapatita e colágeno tipo I (MORRA et al. 2003; RAMMELT et al. 2004; SCHARNWEBER et al. 2004; MORRA et al. 2007; VAN DEN DOLDER & JANSEN 2007; MEIRELLES et al. 2008; YANG et al. 2010); 2) proteínas não-colágenas e fatores de crescimento da MEC óssea (O'TOOLE et al. 2004; WIKESJÖ et al. 2008; SCHOUTEN et al. 2009; BUENO 2010; SUSIN et

al. 2010); e 3) peptídios bioativos (REZANIA et al. 1999; ROESSLER et al. 2001; TOSATTI et al. 2004; GARCIA & REYES 2005; LUTZ et al. 2010; PEREIRA et al. 2013). Como os fatores de crescimento estimulam diferentes funções celulares que podem exercer efeitos positivos na neoformação tecidual, sua disponibilização na superfície de implantes traria benefícios ao processo de osseointegração.

Com efeitos estimuladores do desenvolvimento dos esqueletos cartilagenoso e ósseo (FRANCIS-WEST et al. 1999; KUNIYASU et al. 2003; YOSHIMOTO et al. 2006; MURPHY et al. 2014), o fator de crescimento GDF-5, uma proteína da superfamília do TGF- β , pode representar uma opção interessante para a funcionalização de implantes metálicos osseointegráveis (BUENO 2010). O mecanismo de ação do GDF-5 assemelha-se ao de BMPs (SPIRO et al. 2000; JIN & LI 2013), induzindo à formação ectópica de tecido ósseo (KUNIYASU et al. 2003; YOSHIMOTO et al. 2006). *In vitro*, o GDF-5 estimula os eventos de migração e proliferação celulares, a atividade de ALP e a produção de MEC mineralizada (NAKAMURA et al. 2003; YOSHIMOTO et al. 2006; BUENO 2010; JIN & LI 2013). *In vivo*, exibe efeito dose-dependente sobre osseointegração e osseointegração (POLIMENI et al. 2010; MIN et al. 2011), favorecendo o reparo ósseo em defeitos críticos em cães quando carregado por PLGA (MIN et al. 2011), em contato com implantes dentários (POLIMENI et al. 2010) ou em levantamento de seio maxilar em animais (BROCKMEYER et al. 2014; LEE et al. 2014).

Em estudo anterior de nosso grupo, BUENO (2010) observou efeito positivo da simples adsorção de GDF-5 em superfícies nanoestruturadas de Ti sobre o desenvolvimento do fenótipo osteogênico *in vitro*, resultando em maior

atividade de ALP e maior conteúdo de cálcio em formações de matriz mineralizada. No entanto, considerando a realidade *in vivo*, espera-se que proteínas plasmáticas sejam adsorvidas sobre a superfície do biomaterial nos momentos iniciais do período pós-implantação (SELA et al. 2007; VARIOLA et al. 2011). Assim, seria relevante avaliar os efeitos da pós-adsorção de proteínas do plasma sobre a expressão do fenótipo osteogênico *in vitro* sobre nanotopografia de Ti pré-adsorvida com GDF-5, estudando três proteínas que participam da fase inicial dos processos de reparo tecidual e osseointegração, entre as quais: 1) albumina, a proteína mais abundante do plasma sanguíneo e considerada não adesiva (SOUSA et al. 2004); 2) fibrinogênio, de importância fundamental na cascata de coagulação (KEERE et al. 2008); e 3) fibronectina, com efeitos na adesão e sinalização celulares (SOUSA et al. 2005).

Estudos demonstraram que a estratégia de disponibilização de moléculas na superfície de biomateriais metálicos pode afetar a sua bioatividade (BEUTNER et al. 2010). Enquanto que a estratégia de simples adsorção de GDF-5 sobre nanotopografia de Ti resulta em formação de filme inhomogêneo dessa proteína, com efeitos estimuladores sobre a diferenciação osteogênica (BUENO 2010), o processo de adsorção física via interação eletrostática entre moléculas contendo grupos iônicos de cargas contrárias (poliânion e polieletrólito catiônico), conhecido como método LbL (OLIVEIRA Jr et al. 2001), permitiria a formação de filmes finos e homogêneos de GDF-5 (poliânion), com as características de maior preservação da estrutura molecular e dos aspectos funcionais da proteína em comparação à sua simples adsorção (CAI et al. 2005; SIQUEIRA et al. 2010; CHIEN et al. 2011). Isso poderia potencializar a resposta de osteoblastos sobre superfícies de Ti frente à disponibilização interfacial de

GDF-5. Como os resultados de estudos *in vitro* não correspondem, necessariamente, às observações *in vivo*, pelas características próprias de cada modelo experimental, a avaliação de importantes parâmetros de neoformação óssea adjacente a implantes de Ti em modelo animal deve favorecer a interpretação mais adequada dos potenciais benefícios das diferentes estratégias para funcionalização de GDF-5 visando ao desenvolvimento de novas superfícies de implantes que acelerem e/ou incrementem o processo de osseointegração.

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos da funcionalização de nanotopografia de Ti com GDF-5 sobre o desenvolvimento do fenótipo osteogênico *in vitro* e sobre o processo de reparo ósseo adjacente a superfícies de implantes osseointegráveis em modelo animal.

2.2 Objetivos Específicos

1) Avaliar os efeitos da pós-adsorção de proteínas principais do plasma-albumina, fibrinogênio e fibronectina, em nanotopografia de Ti funcionalizada com GDF-5 por simples adsorção sobre o potencial osteogênico de culturas primárias de células osteoblásticas (Subprojeto 1).

2) Avaliar a progressão de culturas primárias osteogênicas sobre superfícies de Ti recobertas por filmes LbL de GDF-5 em comparação àquelas com GDF-5 funcionalizado por simples adsorção (Subprojeto 2).

3) Avaliar, em tibia de coelhos, a formação óssea adjacente a implantes de Ti com superfície nanoestruturada e funcionalizada com GDF-5 pelos mesmos métodos do item 2 (Subprojeto 3).

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi dividido em três subprojetos, descritos em seguida.

Subprojeto 1

Foram utilizadas culturas primárias de células osteogênicas derivadas de calvária de ratos recém-nascidos em períodos de até 14 dias para avaliar o efeito da pós-adsorção de proteínas principais do plasma- albumina, fibrinogênio e fibronectina, em nanotopografia de Ti com GDF-5 disponibilizado por simples adsorção, sobre a formação de nódulos de matriz mineralizada.

Grupos experimentais

1. *Ti Controle*
2. *Ti Controle + proteína plasmática*
3. *Ti Controle + GDF-5*
4. *Ti Controle + GDF-5 + proteína plasmática*
5. *Nanotopografia de Ti*
6. *Nanotopografia de Ti + proteína plasmática*
7. *Nanotopografia de Ti + GDF-5*
8. *Nanotopografia de Ti + GDF-5 + proteína plasmática*

Dadas as limitações das culturas primárias em relação ao número total de células obtidas para o plaqueamento e a necessidade de se utilizarem repetições em número não inferior a 5 visando à aplicação de testes estatísticos

paramétricos, foram realizadas culturas primárias distintas para cada uma das proteínas estudadas.

Subprojeto 2

Culturas primárias de células osteogênicas foram obtidas para avaliar o desenvolvimento do fenótipo osteogênico sobre filmes de GDF-5 obtidos por LbL em comparação àqueles por simples adsorção, especificamente em relação à formação de matriz mineralizada e à atividade de ALP e expressão de marcadores osteoblásticos por *real time PCR*.

Grupos experimentais

1. *Ti Controle*
2. *Ti Controle + GDF-5 por simples adsorção (Controle+GDF-5/Ads)*
3. *Ti Controle + GDF-5 por LbL (Controle+GDF-5/LbL)*
4. *Nanotopografia de Ti (4h)*
5. *Nanotopografia de Ti + GDF-5 por simples adsorção (4h+GDF-5/Ads)*
6. *Nanotopografia de Ti + GDF-5 por LbL (4h+GDF-5/LbL)*

Subprojeto 3

Implantes de Ti com superfície nanoestruturada e funcionalizada com GDF-5 por simples adsorção ou por filmes LbL foram instalados em tíbias de coelho para avaliar, qualitativa e quantitativamente, a neoformação óssea na região interfacial.

Grupos experimentais

1. *Nanotopografia de Ti*
2. *Nanotopografia de Ti + GDF-5 por simples adsorção*
3. *Nanotopografia de Ti + GDF-5 por LbL*

Descrevem-se, em seguida, os métodos para as avaliações *in vitro* e *in vivo*.

Avaliações *in vitro*

3.1 Caracterização das superfícies de Ti

Discos de Ti comercialmente puro, grau 2, de 13 mm de diâmetro por 2 mm de altura (Realum, São Paulo, SP), usinados, foram lavados em ultra-som, tolueno, e submetidos a condicionamento em solução de H₂SO₄ a 10 N e H₂O₂ a 30% por 4 h (YI et al. 2006; DE OLIVEIRA et al. 2007; VETRONE et al. 2009) à temperatura ambiente (T.A.), sob agitação constante. Os discos foram, em seguida, lavados em água destilada, autoclavados e secos ao ar. Discos controles foram preparados semelhantemente, com exceção à etapa de condicionamento com solução de H₂SO₄ e H₂O₂, que não foi realizada.

3.2 Adsorção de GDF-5

No dia anterior ao plaqueamento das células, superfícies de Ti nanomodificadas, previamente autoclavadas, foram incubadas overnight a 4 °C com GDF-5 a 200 ng/mL (*recombinant human* GDF-5 ou *recombinant mouse* GDF-5, R&D Systems Peprotech, México) em placas de poliestireno de 24 poços, sendo, em seguida, lavadas três vezes com PBS a 37 °C (BUENO 2010).

3.3 Pós-adsorção de proteínas plasmáticas

Considerando que as concentrações plasmáticas de albumina, fibrinogênio e fibronectina variam, respectivamente, entre 30 e 50 mg/mL, 1,5 e 4,0 mg/mL, e 0,3 e 0,4 mg/mL, a incubação das proteínas foram feitas por período de 2 h à T.A., logo após a incubação *overnight* do GDF-5, nas seguintes concentrações (10-fold): albumina a 30 mg/mL (Sigma, St Louis, MO, EUA), fibrinogênio a 3 mg/mL (Sigma) e fibronectina a 0,3 mg/mL (Sigma) em PBS.

3.4 Obtenção dos filmes pelo método LbL

Filmes ultrafinos nanoestruturados em multicamadas foram formados sobre discos nanomodificados de Ti por adsorção física via interação eletrostática entre moléculas contendo grupos iônicos de cargas contrárias. O polieletrólito catiônico usado foi o PAH (Sigma, St Louis, EUA) e o poliânion, o GDF-5 (*recombinant human* GDF-5, Peprotech ou *recombinant mouse* GDF-5, R&D Systems). Inicialmente, foram testadas soluções em PBS com concentração de 0,1 mg/mL, pH 4 ou 12, e tempo de imersão de 10 min para cada adsorção, segundo o procedimento descrito por OLIVEIRA Jr et al. (2001). Entre as imersões, o substrato foi lavado com PBS para retirada do material fracamente adsorvido. O crescimento e a homogeneidade do filme foram provados por medidas de espectroscopia de fluorescência na região do UV-Vis. Dependendo dos resultados dessas medidas, o processo foi otimizado por meio de ajustes de alguns parâmetros, como a concentração dos materiais em solução e o tempo de imersão do substrato. Essas análises foram realizadas no Grupo de Polímeros Bernhard Gross do Instituto de Física e São Carlos - USP.

3.5 Ângulo de contato (Molhamento) e energia livre de superfície

Para o cálculo do ângulo de contato (molhamento de superfície), gotas de 3 µL dos líquidos-sonda, água, etilenoglicol e di-iodometano foram depositadas sobre as superfícies dos discos de Ti e os valores angulares finais, obtidos por meio da média aritmética dos ângulos obtidos em 4 gotas. As medidas foram realizadas por um goniômetro (KSV Instruments, Helsinki, Finlândia). O cálculo da energia livre de superfície foi efetuado a partir dos valores de ângulo de contato obtidos pelo método de Owens & Wendt (GINDL et al. 2001; LAMPROU et al. 2010), no qual a raiz do valor da componente dispersiva e da componente polar pode ser obtida através do coeficiente linear e angular da reta resultante. A soma destes valores resulta na energia de superfície. Os valores das componentes foram determinados a partir da fórmula supracitada e calculados por uma versão matricial, no programa Microsoft Excel.

3.6 Isolamento celular e culturas de células osteogênicas

As células foram isoladas por digestão enzimática seqüencial, com solução de tripsina e collagenase, 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). Todos os procedimentos com animais estavam de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela CEUA do *Campus* de Ribeirão Preto da USP (Protocolo nº 11.1.394.53.2). 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 14 dias em α -MEM (Invitrogen, Carlsbad, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino

(Invitrogen), 7 mM de β -glicerofosfato (Sigma, St Louis, EUA), 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Invitrogen), 5 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico (Sigma) a 37 °C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias e a progressão da cultura, avaliada por microscopia de fase em culturas crescidas sobre poliestireno.

3.7 Atividade de ALP

A atividade de ALP foi avaliada em 7, 9 e 11 dias, por meio 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, MG). Primeiramente, 50 μL 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 μL obtida de cada poço, permanecendo por 10 min a 37°C. Para obter a coloração, foram adicionados 2 mL de Na_2CO_3 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 μmol 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).

3.8 Imunolocalização de ALP

Para avaliar os efeitos das modificações das superfícies de Ti sobre a expressão de ALP, foram utilizadas células osteogênicas da linhagem SAOS-2,

humana (ATCC). Em 48 h pós-plaqueamento, 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. As células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 a 0,5% (Acros Organics, Geel, Bélgica) em PB por 10 min, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 min. Incubou-se anticorpo primário anti-ALP (monoclonal B4-78, 1:100; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, EUA) seguido de anticorpo secundário conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 594 (fluorescência vermelha; 1:200, Molecular Probes). Todas as incubações foram feitas em atmosfera úmida por 60 min à T.A. 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 Zeiss, modelo Axioimager M2 (Carl Zeiss Incorporation, Alemanha) acoplado a uma câmera digital. As imagens adquiridas foram processadas com o programa Adobe Photoshop (CS5.1).

3.9 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: RUNX2, ALP, BSP, OPN e OC. Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene constitutivo HPRT1.

Nos tempos de 7, 9 e 11 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 as reações de *Real-time* PCR, foram utilizadas sondas TaqMan® (Applied Biosystems) em aparelho CFX96 (Bio-Rad, Hercules, EUA), com 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 min 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 (*cycle threshold* – ou ciclo limiar) e todas as amostras foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para o gene de expressão constitutiva HPRT1 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 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN 2001). Usando o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, os dados foram normalizados pela expressão do gene constitutivo HPRT1 e calibrado pelo grupo controle aos 7 dias.

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

Em 14 dias, culturas primárias crescidas sobre os discos de Ti (n=5 para cada grupo) foram lavadas em solução de Hanks, fixadas em álcool etílico a 70% a 4°C por 60 min e lavadas em PBS e água bidestilada. Em seguida, foram coradas com ARS a 2%, pH 4,2, à T.A. por 15 min, lavadas com PBS e água bidestilada. Obtiveram-se imagens macroscópicas das culturas com câmera digital de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel, 6.3 MP, com lente macro EF100 f/2.8).

Morfologicamente, as proporções de áreas marcadas com ARS foram determinadas pelo programa Image Tool (University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, EUA), a partir da transformação binária das imagens macroscópicas das culturas.

Bioquimicamente, acúmulos de cálcio foram quantificados 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%, mantendo-se a placa sob agitação suave por 30 min. A camada de células foi, então, removida 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 hidróxido de amônio a 10% em cada poço. As amostras foram lidas em espectrofotômetro (µQuant, 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 amônio (ácido acético a 10% e hidróxido de amônio a 5 M).

Avaliações *in vivo*

3.11 Implantes de Ti e funcionalização de GDF-5

Foram utilizados implantes auto-rosqueáveis de Ti, usinados, de 3,75 mm de diâmetro e 8,75 mm de comprimento (Conexão, Arujá, SP). Para a obtenção de nanotopografia, realizou-se o mesmo protocolo das avaliações *in vitro* (solução de H₂SO₄/H₂O₂, 1:1, por 4 h). Adicionalmente, a funcionalização de GDF-5 em nanotopografia de Ti por simples adsorção ou por filmes LbL foi realizada à semelhança dos protocolos estabelecidos para os experimentos *in vitro*.

3.12 Animais e procedimento cirúrgico

Foram utilizados nove coelhos machos, adultos jovens, da raça Nova Zelândia, com peso variando entre 3,5 e 4,5 kg. Como pré-anestésico foi administrado por via intramuscular 1,0 mg/kg de acepromazina (Apromazin[®], CentralVet, Vinhedo, SP). A indução anestésica foi realizada através da via intramuscular, pela injeção de 25 mg/kg de quetamina (Dopalen[®], Vetbrands Saúde Animal, Jacareí, SP) e 5,0 mg/kg de xilazina (Rompun[®], Bayer SA, São Paulo, SP). Após a anestesia, foi realizada tricotomia das patas traseiras, bilateralmente e antissepsia da região com solução alcoólica de polivinilpirrolidona iodo a 10% (Riodeine[®] tintura, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP). O campo operatório foi isolado através da aposição de campos esterilizados descartáveis. Foi então realizada uma incisão de aproximadamente 4 cm na região medial da tíbia, próxima à epífise medial, usando lâmina de bisturi nº 15 montada em um cabo nº 3, envolvendo os planos pele e tecido subcutâneo, plano muscular e periósteo, o qual foi descolado e mantido afastado. O preparo das perfurações para instalação dos implantes foi realizado usando fresas cirúrgicas em ordem crescente de diâmetro, montadas em contra-ângulo redutor 16:1 (NSK E16R, Kakanishi Dental MFG Co, Japão), acoplado a um motor elétrico com mostrador de velocidade (BLM 500, VK Driller Equipamentos Elétricos, São Paulo, SP). A velocidade utilizada foi de 900 rotações por minuto, e todas as perfurações foram realizadas sob abundante irrigação externa com solução de cloreto de sódio a 0,9%. Após a perfuração do leito implantar, um implante de Ti foi inserido evitando o contato da superfície do mesmo com contaminantes. Uma chave tipo catraca com torquímetro manual foi usada para instalar o mesmo até a inserção completa no osso. Cada tíbia

recebeu um implante, resultando em dois implantes por animal. Após finalização da colocação do implante e limpeza das feridas, os planos teciduais musculares e cutâneos foram suturados em posição utilizando fio de sutura de nylon 4-0 (Shalon Fios Cirúrgicos Ltda., Goiânia, GO).

No período pós-operatório, para controle da dor, os coelhos receberam doses diárias de cetoprofeno (Ketofen[®], Merial, São Paulo, SP) 3 mg/kg por 3 dias. Seis semanas após a colocação dos implantes, de acordo com as análises programadas, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica de tiopental sódico (Thiopentax[®], Cristal Pharma, Belo Horizonte, MG). Após a eutanásia, os segmentos das tíbias foram removidos, dissecados e posteriormente reduzidos em blocos individuais e processados para análise microtomográfica ou histológica.

3.13 Análise microtomográfica

Os exames microtomográficos foram realizados logo após os sacrifícios dos animais, com os espécimes fixados em formaldeído a 4% tamponado (pH 7). Para aquisição das imagens, foi adotada uma resolução espacial de 12 µm com o microtomógrafo SkyScan[®] 1172 (SkyScan Ltda., Antuérpia, Bélgica), com ajuste de 50 kV de voltagem. Após aquisição e reconstrução tridimensional das imagens, o volume de interesse (VOI) foi determinado, sendo este correspondente à região peri-implantar estendendo-se por 2 mm. Para tal, foi adotada escala de cinza “threshold” de 130 (máximo) e 45 (mínimo) para avaliação do tecido ósseo e de 255 (máximo) e 130 (mínimo) para avaliação dos implantes de Ti. Os valores dos parâmetros obtidos com ajuste de escala de cinza para implantes foram subtraídos dos obtidos com ajuste de escala de cinza

para tecido ósseo com a finalidade de se eliminarem partes remanescentes dos implantes de Ti dentro do VOI e, com isso, obter-se o valor real do tecido ósseo ao redor dos mesmos. Foram realizadas análises microtomográficas da microarquitetura tridimensional da área óssea do BIC (Figura 1A) e na área adjacente (0,2 mm do BIC, Figura 1B). Essas mensurações foram realizadas na região de osso medular e divididas em: a) medular cervical- região medular em íntimo contato com o endóstio (primeira e segunda roscas), b) medular apical- região medular na área mais inferior do implante (terceira e quarta roscas), utilizando-se os seguintes parâmetros:

- a) Volume ósseo;
- b) Porcentual de volume ósseo;
- c) Relação superfície óssea/ volume;
- d) Número de trabéculas;
- e) Espessura trabecular;
- f) Separação trabecular.

Para as análises, utilizaram-se os programas DataViewer[®], versão 1.4.1 (SkyScan Ltda., Antuérpia, Bélgica) e CT Analyser[®], versão 1.11.8.0 (SkyScan).

Figura 1. Microarquiteturas tridimensionais da superfície óssea do BIC (A, laranja) e do osso adjacente (0,2 mm do BIC; B, vermelho), com a área medular cervical situada nas regiões da primeira e segunda roscas e a medular apical, nas da terceira e quarta. Note-se em B a sobreposição das áreas analisadas.

3.14 Processamento histológico e análises histológica e histomorfométrica

Após as análises microtomográficas, os segmentos ósseos foram transferidos para uma solução de etanol a 70%, onde permaneceram por 3 dias. Os espécimes foram desidratados em série crescente de etanol e incluídos em resina acrílica (LR White hard grade, London Resin Company, Berkshire, Reino Unido). Os implantes foram seccionados ao meio no sentido longitudinal utilizando, para isso, um micrótomo de precisão (Exakt, Alemanha), lixados e polidos em sistema de polimento (Exakt). De cada implante foram obtidas duas lâminas para coloração e observação em microscopia de luz. Para isso, a face polida foi colada a uma lâmina de vidro e o bloco, novamente cortado, deixando aderido à lâmina um corte com espessura aproximada de 40 μm , que foi

desgastado e polido até apresentar, aproximadamente, 20 µm de espessura. Essa face foi submetida à coloração utilizando os corantes azul de Stevenel e ARS (MANIATOPOULOS et al. 1986). As análises histológica e histomorfométrica foram realizadas para verificar a formação óssea em contato direto com a superfície dos implantes e à distância. Foram determinadas a porcentagem de contato osso-implante (BIC), a porcentagem de formação óssea entre duas roscas consecutivas (BABT) e a porcentagem de formação óssea na área espelho (BAMA), definida como sendo a área à distância da superfície, simétrica à área entre duas roscas (ROSA et al. 2006; TAVARES et al. 2007). Para isso, as imagens foram capturadas por uma câmera digital DC 300F (Leica), acoplada a um microscópio DMLB (Leica) e as análises, realizadas utilizando o software Leica QWin.

3.15 Análise estatística

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos aos testes de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias. Constatada a normalidade da distribuição amostral, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste de Tukey, quando apropriado. O nível de significância foi de 5%.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Subprojeto 1

Proporção de áreas coradas por ARS (Análise Morfológica)

Pós-adsorção com Albumina

Os resultados para o experimento com albumina estão apresentados na Figura 2.

Figura 2. Porcentagem de área total corada com ARS em culturas osteogênicas para os diferentes grupos experimentais, em 14 dias.

A pós-adsorção de albumina sobre superfícies de Ti diminuiu significativamente o potencial osteogênico das culturas em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos sem albumina, sendo as maiores proporções de áreas coradas em vermelho observadas para Controle+GDF-5, 4h e 4h+GDF-5.

Pós-adsorção com Fibrinogênio

Os resultados para o experimento com fibrinogênio estão apresentados na Figura 3.

Figura 3. Porcentagem de área total corada com ARS em culturas osteogênicas para os diferentes grupos experimentais, em 14 dias. Observou-se diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos Controle e 4h+GDF-5+Fibrinogênio.

A única diferença estatística encontrada neste experimento foi para a comparação entre Controle e 4h+GDF-5+Fibrinogênio, o qual apresentava maior proporção de áreas mineralizadas ($p < 0,05$).

Pós-adsorção com Fibronectina

Os resultados para o experimento com fibronectina estão apresentados na Figura 4.

Figura 4. Porcentagem de área total corada com ARS em culturas osteogênicas para os diferentes grupos experimentais, em 14 dias. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

A pós-adsorção de fibronectina sobre as superfícies de Ti não alterou a mineralização das culturas em relação à porcentagem de área total corada com ARS ($p>0,05$).

Pós-adsorção com Albumina+Fibrinogênio+Fibronectina

Os resultados para o experimento com as proteínas plasmáticas em conjunto estão apresentados na Figura 5.

Figura 5. Porcentagem de área total corada com ARS em culturas osteogênicas para os diferentes grupos experimentais, em 14 dias. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

A pós-adsorção das proteínas plasmáticas sobre as superfícies de Ti não alteraram a mineralização das culturas em relação à porcentagem de área total corada com ARS ($p>0,05$).

Extração de ARS (Análise Bioquímica)

Pós-adsorção com Albumina

Os resultados para o experimento com albumina estão apresentados na Figura 6.

Figura 6. Quantificação de ARS (em valores de densidade óptica) de culturas osteogênicas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 14 dias.

A pós-adsorção de albumina sobre superfícies de Ti diminuiu significativamente o potencial osteogênico das culturas em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Não ocorreram diferenças estatísticas entre os grupos sem albumina.

Pós-adsorção com Fibrinogênio

Os resultados para o experimento com fibrinogênio estão apresentados na Figura 7.

Figura 7. Quantificação de ARS (em valores de densidade óptica) de culturas osteogênicas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 14 dias. Não foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos.

A pós-adsorção de fibrinogênio sobre superfícies de Ti não alterou o potencial osteogênico das culturas primárias ($p > 0,05$).

Pós-adsorção com Fibronectina

Os resultados para o experimento com fibronectina estão apresentados na Figura 8.

Figura 8. Quantificação de ARS (em valores de densidade óptica) de culturas osteogênicas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 14 dias. Apenas a comparação entre Controle e Controle+GDF-5+Fibronectina revelou significância estatística.

A única diferença estatística encontrada neste experimento foi entre os grupos Controle e Controle+GDF-5+Fibronectina, o que difere dos resultados da análise morfológica correspondente ($p < 0,05$).

Pós-adsorção com Albumina+Fibrinogênio+Fibronectina

Os resultados para o experimento com as proteínas plasmáticas conjuntamente estão apresentados na Figura 9.

Figura 9. Quantificação de ARS (em valores de densidade óptica) de culturas osteogênicas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 14 dias. Não foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos.

A pós-adsorção das proteínas plasmáticas sobre superfícies de Ti não alterou o potencial osteogênico das culturas primárias ($p > 0,05$).

4.2 Subprojeto 2

Mensuração do GDF-5 por espectroscopia de fluorescência na região do UV-Vis

Primeiramente, foi medida a absorbância da solução proteica de GDF-5, utilizando espectroscopia fluorescência na região do UV-VIS. Observou-se a presença de um sinal em 280 nm, referente ao comprimento de onda de absorção da tirosina e do triptofano, aminoácidos característicos presentes na estrutura de proteínas (Figura 10).

Figura 10. Espectro UV-VIS para mensuração da absorbância da solução de GDF-5.

A partir deste comprimento de onda de absorção da solução de GDF-5, ela foi excitada em 280 nm para verificar o sinal de emissão no espectrofluorímetro. O sinal de emissão foi observado entre o intervalo que compreende 290 até 400 nm, notando-se a presença de um sinal máximo em 323 nm referente ao aminoácido triptofano (Figura 11).

Figura 11. Espectro de emissão da solução de GDF-5.

Crescimento do filme LbL por espectroscopia fluorescência na região do UV-VIS

O crescimento do filme de GDF-5 pelo método LbL foi acompanhado por espectroscopia de fluorescência, com excitação das amostras em 280 nm e verificação do sinal de emissão no intervalo entre 297 e 380 nm. Observou-se que o sinal do pico de emissão aumentou de acordo com o número de bicamadas, o que pode ser explicado pela maior quantidade de GDF-5 imobilizada pelo método LbL sobre as superfícies de Ti, resultando em aumento do sinal de fluorescência. Além disso, os espectros das 10 bicamadas apresentou pico de emissão centrado entre 334 nm e 337 nm, que coincide com o do aminoácido triptofano presente na estrutura proteica, comprovando a adsorção do filme de GDF-5 à superfície de Ti. O grupo 4h+GDF-5/LbL exibiu maior pico de emissão em relação àquele observado no grupo Controle+GDF-5/LbL (Figuras 12 e 13), o que pode ser atribuído à maior quantidade de proteína imobilizada nessa superfície.

Figura 12. Espectro de emissão do crescimento do filme de GDF-5 fabricado pelo método LbL no grupo 4h+GDF-5/LbL.

Figura 13. Espectro de emissão do crescimento do filme de GDF-5 fabricado pelo método LbL no grupo Controle+GDF-5/LbL.

A partir dos dados do espectro de emissão, foram gerados os gráficos das Figuras 14 e 15, que mostram o valor do pico de fluorescência para cada bicamada formada, centrado em 337 nm. Observa-se, nestas figuras, que o

crescimento do filme foi linear, sugerindo uma constante deposição de filme. Assim, o grupo 4h+GDF-5/LbL obteve maior coeficiente na cinética de adsorção quando comparado ao grupo Controle+GDF-5/LbL.

Figura 14. Cinética de adsorção do filme de GDF-5 fabricado pelo método LbL no grupo 4h+GDF-5/LbL.

Figura 15. Cinética de adsorção do filme de GDF-5 fabricado pelo método LbL no grupo Controle+GDF-5/LbL.

Análise quantitativa dos filmes de GDF-5 formados pelo método da simples adsorção e LbL

Note-se na Figura 16, um sinal mais intenso de fluorescência no grupos Controle+GDF-5/Ads (verde) e 4h+GDF-5/Ads (preto) quando comparado aos grupos Controle+GDF-5/LbL (azul) e 4h+GDF-5/LbL (vermelho), sugerindo uma maior quantidade proteica adsorvida ao método de funcionalização por simples adsorção. O menor sinal foi encontrado no grupo Controle+GDF-5/LbL.

Figura 16. Espectro de emissão de filmes de GDF-5 fabricados pelo método LbL nos grupos Controle+GDF-5/LbL (azul) e 4h+GDF-5/LbL (vermelho) e por simples adsorção grupos Controle+GDF-5/LbL (verde) e 4h+GDF-5/Ads (preto).

Ângulo de Contato (Molhamento) e Energia Livre de Superfície

Os resultados dos valores do ângulo de contato e energia de superfície estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Valores de ângulo de contato entre os grupos experimentais

	Água	Etilenoglicol	Di-Iodometano
Controle+GDF-5/Ads	65,4 ± 0,2	61,2 ± 0,3	39,8 ± 0,2
Controle+GDF-5/LbL	53,8 ± 0,3	51,2 ± 0,2	38,0 ± 0,1
4h+GDF-5/Ads	59,1 ± 0,2	50,4 ± 0,2	44,5 ± 0,1
4h+GDF-5/LbL	51,5 ± 0,3	49,1 ± 0,2	38,1 ± 0,4

Tabela 2. Valores da energia de superfície entre os grupos experimentais

	Energia de Superfície (mJ/m ²)
Controle+GDF-5/Ads	37,7
Controle+GDF-5/LbL	44,1
4h+GDF-5/Ads	41,5
4h+GDF-5/LbL	45,8

Nos 3 líquidos-sonda utilizados, notou-se uma queda dos valores dos ângulos de contato nos grupos com filmes formados pelo método LbL (Controle+GDF-5/LbL e 4h+GDF-5/LbL) quando comparados aos grupos com simples adsorção (Controle+GDF-5/Ads e 4h+GDF-5/Ads), embora sem diferença estatística ($p > 0,05$; Tabela 1). Em relação à energia de superfície, os maiores valores numéricos foram observados para os grupos Controle+GDF-5/LbL e 4h+GDF-5/LbL, mas sem diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$; Tabela 2).

Detecção de acúmulos de cálcio

A Figura 17 apresenta os aspectos macroscópicos de culturas osteogênicas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 14 dias, coradas com ARS, para detecção de acúmulos de cálcio. Note-se, tanto para superfícies de Ti controle como com nanotopografia, aparente redução das formações de nódulos calcificados para os filmes LbL em comparação ao GDF-5 funcionalizado por simples adsorção.

Figura 17. Formações nodulares de matriz mineralizada, coradas por vermelho de Alizarina, de culturas de células osteogênicas crescidas sobre os diferentes substratos de Ti em 14 dias. Notem-se áreas azuladas em culturas sobre os filmes LbL com GDF-5, de menor potencial osteogênico.

Proporção de áreas coradas por ARS (Análise Morfológica)

Os resultados da quantificação das áreas coradas por ARS estão apresentados na Figura 18.

Figura 18. Porcentagem de área total corada com vermelho de Alizarina em culturas osteogênicas para os diferentes grupos experimentais, em 14 dias.

Independentemente do GDF-5 utilizado, se recombinante humano ou murino, maiores porcentagens de áreas de mineralização foram encontradas nos grupos 4h e 4h+GDF-5/Ads quando comparados aos demais ($p < 0,05$), sendo ambos os grupos semelhantes entre si.

Extração de ARS (Análise Bioquímica)

Os resultados da extração de ARS estão apresentados na Figura 19.

Figura 19. Quantificação de ARS (em valores de densidade óptica) de culturas osteogênicas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 14 dias.

Em ambos os experimentos (GDF-5 humano e murino), os maiores valores da quantificação bioquímica de ARS foram observados para os grupos 4h e 4h+GDF-5/Ads quando comparados aos demais ($p < 0,05$), sendo ambos os grupos semelhantes entre si.

Atividade de Fosfatase Alcalina (ALP)

Os resultados da atividade de ALP em 7, 9 e 11 dias estão apresentados na Figura 20.

Figura 20. Atividade de ALP (em μmol de timolftaleína/h/mg de proteína) de culturas primárias osteogênicas crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 7, 9 e 11 dias.

Em 7 dias, o maior valor de atividade de ALP foi observado no grupo 4h+GDF-5/Ads em relação aos grupos Controle+GDF-5/LbL, 4h+GDF-5/LbL e Controle ($p < 0,05$). Em 9 dias, os valores de atividade de ALP foram maiores nas superfícies nanoestruturadas (4h, 4h+GDF-5/Ads e 4h+GDF-5/LbL) quando comparados aos dos controles (Controle, Controle+GDF-5/Ads e Controle+GDF-5/LbL, $p < 0,05$). Em 11 dias, o grupo Controle+GDF-5/LbL obteve o menor valor de atividade de ALP ($p < 0,05$).

Imunolocalização de ALP

Após 48 h, células SAOS-2 crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti exibiam um padrão de marcação para ALP puntiforme e localizada

predominantemente nos limites celulares, sendo mais intensa no grupo 4h+GDF-5/LbL e rara nos grupos Controle e Controle+GDF-5/Ads (Figura 21).

Figura 21. Epifluorescência de células SAOS-2 crescidas sobre Ti por 48 h (A-F). Ti Controle (A), Controle+GDF-5/Ads (B), Controle+GDF-5/LbL (C), 4h (D), 4h+GDF-5/Ads (E) e 4h+GDF-5/LbL (F). Fluorescência vermelha indica marcação para ALP e fluorescência azul, núcleos celulares. Barra de escala para A-F = 100 μ m.

Análise do grau de diferenciação osteoblástica por Real time PCR

Os resultados da expressão de RUNX2, ALP, BSP, OPN e OC em 7, 9 e 11 dias estão apresentados nas Figuras 22 a 26.

Em 7 dias, os maiores níveis de expressão de RUNX2 foram observados para o grupo Controle+GDF-5/LbL, seguido pelo Controle e Controle+GDF-5/Ads ($p < 0,05$). Em 9 dias, o grupo Controle+GDF-5/LbL mantinha os maiores níveis de expressão para RUNX2, seguido pelo Controle, que exibiu valores superiores aos dos grupos 4h e 4h+GDF-5/LbL ($p < 0,05$). Em 11 dias, culturas do grupo Controle+GDF-5/LbL exibiam os maiores níveis de expressão de RUNX2 ($p < 0,05$), não sendo observadas diferenças significantes para as demais comparações ($p > 0,05$, Figura 22).

Figura 22. Expressão de RUNX2 em culturas primárias osteogênicas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 7, 9 e 11 dias. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo HPRT1, calibrados pelo Controle em 7 dias.

Em 7 dias não ocorreram diferenças significantes entre os grupos para os valores de expressão de ALP. Em 9 dias, o grupo Controle+GDF-5/Ads exibiu maiores valores de expressão de ALP quando comparado aos demais ($p < 0,05$), com exceção para Controle+GDF-5/LbL. Em 11 dias, o grupo Controle manteve maiores valores de expressão de ALP em relação aos demais ($p < 0,05$), com exceção para Controle+GDF-5/LbL, que exibiu níveis de ALP superiores aos dos grupos Controle+GDF-5/Ads e 4h+GDF-5/Ads ($p < 0,05$; Figura 23).

Figura 23. Expressão de ALP em culturas primárias osteogênicas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 7, 9 e 11 dias. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo HPRT1, calibrados pelo Controle em 7 dias.

Em 7 dias, o grupo Controle+GDF-5/LbL exibiu níveis superiores de expressão de BSP em relação ao grupo 4h ($p < 0,05$). Em 9 dias, os grupos Controle+GDF-5/Ads e Controle+GDF-5/LbL exibiam maiores valores na expressão de BSP quando comparados aos demais ($p < 0,05$), sem, no entanto, apresentarem diferenças entre si ($p > 0,05$). Em 11 dias, o grupo Controle+GDF-5/LbL exibiu maiores valores de expressão de BSP quando comparado aos demais, com exceção para o Controle, enquanto que os grupos Controle+GDF-5/Ads e 4h+GDF-5/Ads exibiram os menores níveis de expressão desse gene ($p < 0,05$, Figura 24).

Sialoproteína Óssea

Figura 24. Expressão de BSP em culturas primárias osteogênicas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 7, 9 e 11 dias. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo HPRT1, calibrados pelo Controle em 7 dias.

Em 7 dias, os maiores níveis de OPN foram observados no grupo 4h+GDF-5/LbL, seguido por Controle+GDF-5/LbL e 4h+GDF-5/Ads ($p < 0,05$). Em 9 dias, os grupos Controle+GDF-5/LbL e 4h+GDF-5/LbL exibiram os maiores valores de expressão de OPN em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$), sendo os valores de Controle+GDF-5/LbL maiores que os de 4h+GDF-5/LbL ($p < 0,05$). Em 11 dias, a maior expressão de OPN foi observada nos grupos Controle+GDF-5/LbL e 4h+GDF-5/LbL, semelhantes entre si. O grupo 4h apresentou os menores valores de RNAm para OPN quando comparados com os demais, exceto o Controle ($p < 0,05$, Figura 25).

Figura 25. Expressão de OPN em culturas primárias osteogênicas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 7, 9 e 11 dias. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo HPRT1, calibrados pelo Controle em 7 dias.

Em 7, 9 e 11 dias, os grupos Controle+GDF-5/LbL e 4h+GDF-5/LbL exibiam maior expressão de OC quando comparados aos demais ($p < 0,05$), sendo que os valores para Controle+GDF-5/LbL eram maiores em comparação àqueles para 4h+GDF-5/LbL nos três tempos ($p < 0,05$). Não se observaram diferenças significantes entre Controle, Controle+GDF-5/Ads, 4h e 4h+GDF-5/Ads (Figura 26).

Figura 26. Expressão de OC em culturas primárias osteogênicas sobre as diferentes superfícies de Ti, em 7, 9 e 11 dias. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo HPRT1, calibrados pelo Controle em 7 dias.

4.3 Subprojeto 3

Análise microtomográfica

As reconstruções tridimensionais obtidas a partir das microtomografias revelaram formação óssea em íntimo contato com as superfícies dos implantes, aparentemente sem qualquer diferença importante entre os grupos. Parte dessa formação óssea parecia originar-se da superfície interna do osso cortical adjacente, constituindo-se em trabéculas de diferentes dimensões (Figura 27).

Figura 27. Reconstruções 3D de espécimes representativos dos 3 grupos experimentais, 4h (A), 4h+GDF-5/Ads (B) e 4h+GDF-5/LbL, no tempo de 6 semanas. Notem-se formações ósseas em íntimo contato com a superfície dos implantes, algumas das quais aparentemente originadas da superfície interna de corticais adjacentes.

Com relação aos 6 parâmetros microtomográficos avaliados, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, tanto na área óssea em contato com implante (BIC) como na área óssea adjacente. As análises microtomográficas na região de BIC estão apresentadas na Figura 28.

Figura 28. Parâmetros morfométricos referentes ao volume ósseo (A), porcentual de volume ósseo (B), relação superfície óssea/ volume (C), espessura trabecular (D), número de trabéculas (E) e a separação trabecular (F), obtidos a partir de imagens tridimensionais reconstruídas por microtomografia dos grupos 4h, 4h+GDF-5/Ads e 4h+GDF-5/LbL em 6 semanas. Não se observaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos na região de BIC.

As análises microtomográficas na região óssea adjacente estão apresentadas na Figura 29.

Figura 29. Parâmetros morfométricos referentes ao volume ósseo (A), porcentual de volume ósseo (B), relação superfície óssea/ volume (C), espessura trabecular (D), número de trabéculas (E) e a separação trabecular (F), obtidos a partir de imagens tridimensionais reconstruídas por microtomografia dos grupos 4h, 4h+GDF-5/Ads e 4h+GDF-5/LbL em 6 semanas. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre grupos na região óssea adjacente.

Análises histológica e histomorfométrica

Em 6 semanas, os implantes dos grupos 4h, 4h+GDF-5/Ads e 4h+GDF-5/LbL estavam histologicamente osseointegrados, sem qualquer evidência de processo inflamatório ou de formação de cápsula fibrosa em áreas adjacentes à sua superfície. Para os 3 grupos, as interfaces de contato osso-implante exibiam formações de osso imaturo de diferentes espessuras e contornos, não

necessariamente depositadas em íntimo contato com as superfícies de Ti (Figura 30).

Figura 30. Secções méso-distais de implantes dos grupos 4h (A,B), 4h+GDF-5/Ads (C,D) e 4h+GDF-5/LbL (E,F) em 6 semanas. Observe-se, em todos os grupos, osso imaturo neoformado, de diferentes espessuras e contornos, não necessariamente em contato íntimo com o Ti. Vermelho de Alizarina e azul de Stevenel. Barra de escala = 200 μ m.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) para os valores de BIC, BAPT e BAMA entre os grupos, apesar de tendência a valores maiores para 4h+GDF-5/LbL (Figuras 31 a 33).

Figura 31. Porcentagem de contato osso-implante (BIC) nos grupos 4h, 4h+GDF-5/Ads e 4h+GDF-5/LbL em 6 semanas. Não se observaram diferenças estatisticamente significantes entre grupos, apesar de tendência a valores maiores para 4h+GDF-5/LbL.

Figura 32. Porcentagem de área de osso mineralizado formada entre as espiras do implante (BABT) nos grupos 4h, 4h+GDF-5/Ads e 4h+GDF-5/LbL em 6 semanas. Apesar de não se detectarem diferenças estatisticamente significantes entre grupos, note-se tendência a valores maiores para 4h+GDF-5/LbL.

Figura 33. Porcentagem da área de osso formada na área espelho (BAMA) nos grupos 4h, 4h+GDF-5/Ads e 4h+GDF-5/LbL em 6 semanas. Apesar de não se detectarem diferenças estatisticamente significantes entre grupos, note-se tendência a valores maiores para 4h+GDF-5/LbL.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os efeitos da funcionalização de nanotopografia de Ti com GDF-5 sobre a atividade osteogênica *in vitro* e *in vivo* foram avaliados em relação à pós-adsorção de três importantes proteínas plasmáticas- albumina, fibrinogênio e fibronectina, isoladas ou conjuntamente, e quanto à forma de disponibilização do fator de crescimento, se por simples adsorção ou por filmes LbL. Os resultados mostraram que a pós-adsorção de componentes do plasma e o método de funcionalização adotado podem afetar a aquisição do fenótipo osteogênico de culturas primárias e que as diferenças observadas *in vitro* podem não ser detectadas em modelo de instalação de implantes osseointegráveis. Essas observações refletem o alto grau de complexidade que se caracteriza a interpretação dos efeitos biológicos da funcionalização de superfícies de Ti com moléculas bioativas e seus potenciais benefícios para o reparo tecidual na região interfacial, mesmo quando se utiliza um único fator de crescimento em uma única concentração para todas as avaliações.

A estratégia de promover a pós-adsorção de proteínas plasmáticas foi a de simular, em um ambiente controlado, os possíveis efeitos da interação de elementos do plasma sanguíneo com as superfícies de Ti funcionalizadas com GDF-5 por simples adsorção. Os resultados mostraram que a pós-adsorção de fibrinogênio ou de fibronectina não promoveu alteração significativa do potencial osteogênico das culturas, enquanto que a de albumina inibiu drasticamente a formação de matriz mineralizada. Entretanto, quando as três proteínas eram pós-adsorvidas conjuntamente, não se observava o efeito inibidor da albumina. Na literatura, os efeitos da albumina sobre a atividade osteoblástica *in vitro* são descritos como

estimuladores da proliferação celular, pela ativação da via MAP quinase (ISHIDA & YAMAGUCHI 2005; HINDIÉ et al. 2011), e da síntese de colágeno, mas inibidores da expressão de RUNX2 (ISHIDA & YAMAGUCHI 2005), o que refletiria em um atraso na aquisição do fenótipo osteogênico das culturas. Para alguns substratos, no entanto, a albumina é considerada uma proteína não-adesiva (PEGUEROLES et al. 2012), na dependência de sua concentração, o que afetaria negativamente a viabilidade e a sobrevivência iniciais de células comprometidas com a diferenciação osteoblástica, resultando também em redução dos nódulos de mineralização. No experimento de pós-adsorção com as três proteínas conjuntamente, a interação da albumina com o fibrinogênio e a fibronectina explicaria a ausência dos efeitos inibidores da albumina sobre a diferenciação osteoblástica, como descrito para células MC3T3-E1 (ISHIDA & YAMAGUCHI 2005; SOUSA et al. 2008). Considerando os limitados benefícios ao aumento da atividade osteogênica com os diferentes tratamentos utilizados nos ensaios de pós-adsorção, possivelmente devido à alta diferenciação osteogênica característica de culturas primárias derivadas de calvárias de ratos (NANCI et al. 1996; IRIE et al. 1998), seria relevante avaliar, em culturas com menor potencial osteogênico, os efeitos da presença de elementos do coágulo sanguíneo sobre superfícies de Ti, se potencializadores ou inibidores da molécula funcionalizada.

Os resultados do subprojeto 2 mostraram diferenças significativas no desenvolvimento do fenótipo osteogênico em função da topografia de superfície de Ti (usinada ou com nanotopografia) e do método de funcionalização de GDF-5 (por simples adsorção ou filmes LbL), tanto para o GDF-5 recombinante de camundongo como para o recombinante humano (altamente homólogos; HÖTTEN et al. 1994). A maior diferenciação osteogênica ocorreu sobre Ti com nanotopografia funcionalizada

com GDF-5 por simples adsorção, o que coincide com os descritos efeitos estimuladores da osteogênese pela nanoestruturação química de superfícies de Ti (DE OLIVEIRA et al. 2007; VETRONE et al. 2009, VARIOLA et al. 2011) e pela disponibilização de GDF-5 para células da linhagem osteoblástica (YOSHIMOTO et al. 2006; BUENO 2010; JIN & LI 2013). As superfícies de Ti com nanotopografia, quando funcionalizadas com GDF-5, perdiam sua alta hidrofiliabilidade, responsável, pelo menos em parte, pelo aumento da atividade osteogênica interfacial (DE OLIVEIRA et al. 2007), tornando-se moderadamente hidrofóbicas. Interessantemente, os filmes LbL afetaram negativamente o potencial osteogênico *in vitro*, independentemente das superfícies de Ti sobre as quais eles eram montados, resultando, à coloração com ARS, em culturas celulares predominantemente azuladas, sugestivo de maior celularidade, com reduzidas áreas avermelhadas, mineralizadas. A maior mineralização nos grupos com simples adsorção pode estar diretamente relacionada à maior quantidade de GDF-5 disponível na superfície de Ti quando comparada àquela de filmes LbL, como determinado por espectroscopia de fluorescência. Adicionalmente, proteínas disponibilizadas por simples adsorção tendem a exibir dessorção superior àquelas de filmes LbL, formados via interação eletrostática, uma ligação muito mais forte quando comparada à ligação proteína/substrato que ocorre em simples adsorção (OLIVEIRA Jr et al. 2001). Assim, como resultado das interações com as proteínas presentes no soro fetal bovino nos primeiros dias de cultura, a dessorção maior de GDF-5 permitiria seus efeitos estimuladores sobre a atividade osteoblástica nas diversas camadas de células que caracterizam as áreas de diferenciação osteoblástica no modelo de cultura utilizado (PEREIRA et al. 2013); para os filmes LbL, os efeitos do GDF-5 tenderiam a se restringir às células que estabelecem interface com a superfície de

Ti, em estágios iniciais de diferenciação osteoblástica. No entanto, até o presente momento, não se conhece a dinâmica de dessorção de GDF-5 para as duas estratégias de funcionalização adotadas. Por fim, a redução da atividade osteogênica em culturas sobre filmes LbL poderia também ser explicada pela quantidade de bicamadas montadas (10, em nosso estudo). De acordo com CHIEN et al. (2011), as propriedades mecânicas de filmes LbL podem desempenhar um papel crítico na modulação do comportamento de osteoblastos. Para esses autores, quanto menor o número de bicamadas, maiores serão a adesão e proliferação celulares e a atividade osteogênica. A redução de bicamadas, entretanto, levaria a uma redução substancial na quantidade de GDF-5 disponibilizada nos filmes LbL, limitando os potenciais benefícios de sua funcionalização.

Além da análise de mineralização das culturas em 14 dias, foram avaliadas a atividade de ALP e a expressão de RNAm para RUNX2, ALP, BSP, OPN e OC em 3 períodos anteriores ao de 14 dias (7, 9 e 11 dias), mas também pós-proliferativos, permitindo a comparação entre os grupos do grau de comprometimento das populações celulares com a diferenciação osteoblástica (PEREIRA et al. 2013). Pela alta homologia entre o GDF-5 recombinante de camundongo e humano (HÖTTEN et al. 1994), que no presente estudo exibiram efeitos semelhantes sobre a mineralização das culturas, optou-se pelo humano para a avaliação de marcadores osteoblásticos.

Em relação à atividade de ALP, os resultados mostraram valores significativamente maiores para as culturas crescidas sobre nanotopografia de Ti em comparação à superfície usinada, o que está de acordo com dados da literatura (DE OLIVEIRA et al. 2007). Apesar dos efeitos estimuladores conhecidos do GDF-5 sobre a atividade de ALP (YOSHIMOTO et al. 2006; JIN & LI 2013), houve apenas

uma tendência a valores maiores para culturas crescidas sobre superfícies funcionalizadas com GDF-5 por simples adsorção em comparação àquelas não funcionalizadas, ainda que exibindo células fortemente imunomarcadas para ALP. Interessantemente, a presença de filmes LbL não induzia a um aumento de atividade da enzima, cujos valores, em 7 e 11 dias, eram inferiores àqueles para GDF-5 por simples adsorção. Os efeitos do GDF-5 sobre a atividade de ALP são dose-dependentes para alguns fenótipos celulares, incluindo osteoblastos (LEHMANN et al. 2006; SUMITA et al. 2010; ZHONG et al. 2010), o que permite a interpretação de que os níveis de GDF-5 no meio extracelular estariam reduzidos para culturas crescidas sobre LbL devido às características da dinâmica de dessorção (disponibilização lenta e em quantidades reduzidas) quando fatores de crescimento são incorporados a esses filmes (MA et al. 2007; GRIBOVA et al. 2012). Quando se confrontaram atividade de ALP e o potencial osteogênico *in vitro*, notou-se que valores altos de atividade da enzima, como os observados para o grupo 4h+GDF-5/LbL, não necessariamente correspondiam à maior mineralização das culturas. Essa não correspondência tem sido descrita na literatura e deve ser atribuída ao método para determinar a atividade de ALP (discutido em SOARES 2014). Utilizando um método de maior especificidade, em que a ALP é clivada a partir da fração de membrana por uma fosfolipase e não por proteases e/ou solventes orgânicos, SOARES (2014) observou que os níveis de atividade de ALP de membrana aos 7 dias se correlacionavam positivamente com a mineralização das culturas aos 14 dias, à semelhança do observado para a expressão de RUNX2, BSP e ALP aos 7 dias, o que justificaria seu uso como marcador inicial da diferenciação osteoblástica e indicativo do potencial osteogênico de culturas primárias,

diferentemente dos resultados descritos por HOEMANN et al. (2009) e pelo presente estudo.

Analisados conjuntamente, ainda que de interpretação complexa, os resultados quantitativos de RNAm mostraram que para todos os grupos as culturas exibiam indicadores de diferenciação osteoblástica, a julgar pela expressão relativamente constante de RUNX2 e de sempre pelo menos mais dois marcadores, com diferenças significativas para algumas comparações. Apesar de a expressão de proteínas não colágenas ser variável em osteoblastos ativos, como demonstrado por LIU et al. (1994) e LIU et al. (1997), foi interessante notar que as culturas crescidas sobre filmes LbL exibiam importante sobre-expressão de OPN e OC em momentos anteriores ao esperado para sua expressão, tardiamente durante a formação de nódulos de mineralização. Os reconhecidos efeitos inibidores de OPN e OC sobre, respectivamente, a mineralização da MEC e a atividade de osteoblastos (DUCY et al. 1996; HARMEY et al. 2006; HOLM et al. 2014) poderiam explicar a inibição e/ou o atraso da aquisição do fenótipo osteogênico para os grupos LbL, ainda que as culturas mantivessem o potencial para aquisição desse fenótipo. O(s) fator(es) que promove(m) a sobre-expressão de OPN e OC em culturas que progridem sobre filmes LbL contendo GDF-5 são até agora desconhecidos e devem ser posteriormente investigados.

Para avaliar o impacto do método de disponibilização de GDF-5 em um modelo animal de implantes de Ti em tíbias de coelhos, optamos por funcionalizar apenas a superfície com nanotopografia, que possibilita disponibilizar as maiores quantidades de GDF-5 para a região interfacial, como já discutido anteriormente. O modelo de tíbia de coelho foi escolhido devido à facilidade de manuseio e implantação, à rápida maturidade sexual do animal e ao período pós-implantação

necessário para que ocorra a osseointegração, de 6 semanas, interpretado como relativamente curto (IVANOFF et al. 1996). Adicionalmente, os sítios de implantação na tíbia assemelham-se ao osso do tipo IV, que ocorre principalmente na região posterior de maxila em humanos e apresenta a menor taxa de sucesso se comparada à de outras áreas maxilares (MAPARA et al. 2012). Os resultados das análises microtomográfica, histológica e histomorfométrica dos 3 grupos mostraram-se semelhantes qualitativa e quantitativamente, com uma tendência a maiores valores de BIC, BAPT e BAMA para as superfícies funcionalizadas e, entre essas, para os filmes LbL. Enquanto que resultados biológicos mais expressivos frente a modificações nanotopográficas de superfícies de Ti devam ser observados durante os primeiros dias do período pós-implantação (WAZEN et al. 2013), é possível notar diferenças qualitativas e quantitativas no processo de reparo ósseo em semanas quando modificações microtopográficas são avaliadas (TAVARES et al. 2007). Ainda que efeitos sobre a formação inicial da matriz óssea *in vivo* pudessem ocorrer à semelhança do observado para os experimentos *in vitro*, os resultados de 6 semanas permitem questionar os reais benefícios da funcionalização de GDF-5, na concentração e métodos utilizados, sobre o processo de osseointegração de implantes metálicos. A aparente divergência entre a atividade osteogênica *in vitro* e *in vivo* frente aos filmes LbL merece também atenção, justificando a necessidade de análises mais completas, em diferentes modelos experimentais, quando da avaliação de novos biomateriais para aplicações ósseas ou de modificações dos já existentes. Os resultados do presente estudo são inéditos na literatura e contribuem, incrementalmente, para o melhor entendimento de diferentes aspectos da resposta de osteoblastos e do tecido ósseo quando se propõe a estratégia de funcionalização de superfície de Ti com moléculas bioativas.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que:

- 1) a pós-adsorção de proteínas plasmáticas sobre superfícies de Ti funcionalizadas com GDF-5 não afetou o potencial osteogênico *in vitro*, com exceção para o efeito inibidor da albumina;
- 2) tanto a topografia de superfície de Ti (usinada ou com nanotopografia) como o método de funcionalização de GDF-5 (por simples adsorção ou filmes LbL) afetaram, quantitativamente, as formações de matriz mineralizada, com a maior diferenciação osteogênica para Ti com nanotopografia funcionalizada com GDF-5 por simples adsorção e a menor, para os filmes LbL, independentemente das superfícies sobre as quais eles eram montados;
- 3) a atividade de ALP foi maior em culturas sobre nanotopografia de Ti, incluindo aquelas funcionalizadas com GDF-5, cujos valores, no entanto, não corresponderam, necessariamente, à maior atividade osteogênica *in vitro*. Apesar disso, todos os grupos exibiram a expressão de marcadores de diferenciação osteoblástica;
- 4) os resultados das análises microtomográfica, histológica e histomorfométrica não revelaram diferenças qualitativas e quantitativas *in vivo* entre nanotopografias de Ti funcionalizadas ou não com GDF-5, ainda que uma tendência à maior formação óssea tenha sido observada para as superfícies funcionalizadas e, entre essas, para os filmes LbL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beutner R, Michael J, Schwenzer B, Scharnweber D. Biological nano-functionalization of titanium-based biomaterial surfaces: a flexible toolbox. **J R Soc Interface** 2010;71:93-105.

Bornstein MM, Cionca N, Mombelli A. Systemic conditions and treatments as risks for implant therapy. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2009;24:12-27.

Brockmeyer P, Lange K, Hahn W, Schliephake H, Matthias Gruber R. Increase of homogenous new bone formation using osteoinductive factor rhGDF-5 during sinus floor augmentation in Goettingen Minipigs. **Clin Oral Implants Res** 2014 Jul 17. doi: 10.1111/clr.12457. [Epub ahead of print]

Bueno RBL. Desenvolvimento do fenótipo osteogênico *in vitro* sobre diferentes nanotopografias de titânio funcionalizadas com o fator de crescimento GDF-5. 2010. 74f. (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Cai K, Rechtenbach A, Hao J, Bossert J, Jandt KD. Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: characterization and cell behaviour aspects. **Biomaterials** 2005;26:5960-5971.

Chien HW, Tan SF, Wei KL, Tsai WB. Modulation of the functions of osteoblast-like cells on poly(allylamine hydrochloride) and poly(acrylic acid) multilayer films. **Colloids Surf B Biointerfaces** 2011;88:297-303.

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

Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. **Nature** 1996;382:448-452.

Elias KL, Price RL, Webster TJ. Enhanced functions of osteoblasts on nanometer diameter carbon fibers. **Biomaterials** 2002;23:3279-3287.

Francis-West P, Abdelfattah A, Chen P, Allen C, Parish J, Ladher R, Allen S, MacPherson S, Luyten F, Archer C. Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. **Development** 1999;126:1305-1315.

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

Gindl M, Sinn G, Gindl W, Reiterer A, Tschegg S. A Comparison of different methods to calculate the surface free energy of wood using contact angle measurements. **Colloids Surf A** 2001;181:279-287.

Goldman M, Juodzbaly G, Vilkinis V. Oral Titanium surfaces with nanostructures influence on osteoblasts proliferation: a systematic review. **J Oral Maxillofac Res** 2014; 5:e1. doi: 10.5037/jomr.2014.5301.

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.

Gribova V, Auzely-Velty R, Picart C. Polyelectrolyte Multilayer Assemblies on Materials Surfaces: From Cell Adhesion to Tissue Engineering. **Chem Mater** 2012;24:854-869.

Harmey D, Johnson KA, Zelken J, Camacho NP, Hoylaerts MF, Noda M, Terkeltaub R, Millán JL. Elevated skeletal osteopontin levels contribute to the hypophosphatasia phenotype in *Akp2*(-/-) mice. **J Bone Miner Res** 2006;21:1377-1386.

Hindié M, Degat MC, Gaudière F, Gallet O, Van Tassel PR, Pauthe E. Pre-osteoblasts on poly(L-lactic acid) and silicon oxide: Influence of fibronectin and albumin adsorption. **Acta Biomater** 2011;7:387-394.

Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. *In vitro* osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. **Pathol Biol** 2009;57:318-323.

Holm E, Gleberzon JS, Liao Y, Sørensen ES, Beier F, Hunter GK, Goldberg HA. Osteopontin mediates mineralization and not osteogenic cell development *in vitro*. **Biochem J** 2014;464:355-364.

Hötten G, Neidhardt H, Jacobowsky B, Pohl J. Cloning and expression of recombinant human growth/differentiation factor 5. **Biochem Biophys Res Commun** 1994;28:646-652.

Hovgaard MB, Rechendorff K, Chevallier J, Foss M, Besenbacher F. Fibronectin adsorption on tantalum: the influence of nanoroughness. **J Phys Chem B** 2008;28:8241-8249.

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.

Ishida K, Yamaguchi M. Albumin regulates Runx2 and alpha1 (I) collagen mRNA expression in osteoblastic cells: comparison with insulin-like growth factor-I. **Int J Mol Med** 2005;16:689-694.

Ivanoff CJ, Sennerby L, Lekholm U. Influence of mono- and bicortical anchorage on the integration of titanium implants. A study in the rabbit tibia. **Int J Oral Maxillofac Surg** 1996;25:229-235.

Jin L, Li X. Growth differentiation factor 5 regulation in bone regeneration. **Curr Pharm Des** 2013;19:3364-3373.

Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. **Clin Oral Implants Res** 2009;20:185-206.

Keere IV, Willaert R, Hubin A, Vereecken J. Interaction of human plasma fibrinogen with commercially pure titanium as studied with atomic force microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy. **Langmuir** 2008;24:1844-1852.

Khang D, Lu J, Yao C, Haberstroh KM, Webster TJ. The role of nanometer and sub-micron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium. **Biomaterials** 2008;29:970-983.

Kuniyasu H, Hirose Y, Ochi M, Yajima A, Sakaguchi K, Murata M, Pohl J. Bone augmentation using rhGDF-5-collagen composite. **Clin Oral Implants Res** 2003;14:490-499.

Lamprou DA, Smith JR, Nevella TG, Barbu E, Stone C, Willis CR, Tsibouklis J, A Comparative study of surface energy data from atomic force microscopy and from contact angle goniometry. **Appl Surf Sci** 2010;256:5082-5087.

Le Guehennec L, Martin F, Lopez-Heredia MA, Louarn G, Amouriq Y, Cousty J, Layrolle P. Osteoblastic cell behavior on nanostructured metal implants. **Nanomed** 2008;3:61-71.

Lee J, Wikesjö UM. Growth/differentiation factor-5: pre-clinical and clinical evaluations of periodontal regeneration and alveolar augmentation—review. **J Clin Periodontol** 2014;41:797-805.

Lehmann K, Seemann P, Boergermann J, Morin G, Reif S, Knaus P, Mundlos S. A novel R486Q mutation in BMPR1B resulting in either a brachydactyly type C/symphalangism-like phenotype or brachydactyly type A2. **Eur J Hum Genet** 2006;14:1248-1254.

Liu F, Malaval L, Gupta AK, Aubin JE. Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. **Dev Biol** 1994;166:220-234.

Liu F, Malaval L, Aubin JE. The mature osteoblast phenotype is characterized by extensive plasticity. **Exp Cell Res** 1997;102:97-105.

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

Lord MS, Foss M, Besenbacher F. Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response. **Nano Today** 2010;5:66-78.

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, Nonhoff 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.

Ma L, Zhou J, Gao C, Shen J. Incorporation of basic fibroblast growth factor by a layer-by-layer assembly technique to produce bioactive substrates. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater** 2007;83:285-292.

Maniatopoulos C, Rodriguez A, Deporter DA, Melcher AH. An improved method for preparing histological sections of metallic implants. **Int J Oral Maxillofac Implants** 1986;1:31-37.

Mapara M, Thomas B, Bhat K. Rabbit as an animal model for experimental research. **Dental Res J** 2012;9:111-118.

Meirelles L, Arvidsson A, Albrektsson T, Wennerberg A. Increased bone formation to unstable nano rough titanium implants. **Clin Oral Implants Res** 2007;18:326-332.

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; 28:3822-3835.

Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. The combination of micron and nanotopography by H₂SO₄/H₂O₂ treatment and its effects on osteoblast-specific gene expression of hMSCs. **J Biomed Mater Res A** 2010;94:169-179.

Mendonça G, Mendonça DB, Simões LG, Araújo AL, Leite ER, Duarte WR, Cooper LF, Aragão FJ. Nanostructured alumina-coated implant surface: effect on osteoblast-related gene expression and bone-to-implant contact *in vivo*. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2009;24:205-215.

Min CK, Wikesjö UM, Park JC, Chae GJ, Pippig SD, Bastone P, Kim CS, Kim CK. Wound healing/regeneration using recombinant human growth/differentiation factor-5 in an injectable poly-lactide-co-glycolide-acid composite carrier and a one-wall intra-bony defect model in dogs. **J Clin Periodontol** 2011;3:261-268.

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

Morra M. Biomolecular modification of implant surfaces. **Expert Rev Med Devices** 2007;4:361-372.

Moy PK, Medina D, Shetty V, Aghaloo TL. Dental implant failure rates and associated risk factors. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2005;20:569-577.

Murphy MK, Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA. TGF- β 1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells. **Stem Cells** 2014 Nov 6. doi: 10.1002/stem.1890.

Nakamura T, Yamamoto M, Tamura M, Izumi Y. Effects of growth/differentiation factor-5 on human periodontal ligament cells. **J Periodontal Res** 2003;38:597-605.

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.

Oliveira Jr ON, He JA, Zucolotto V, Balasubramanian S, Nalwa HS, Li L, Kumar J, Ripathy SKT. Handbook of polyelectrolytes and their applications. Polyelectrolyte-Based Multilayers, Self-Assemblies and Nanostructures. Academic Press, San Diego 2001;1:1-4.

O'Toole GC, Salih E, Gallagher C, FitzPatrick D, O'Higgins N, O'Rourke SK. Bone sialoprotein-coated femoral implants are osteoinductive but mechanically compromised. **J Orthop Res** 2004;22:641-646.

Pegueroles M, Tonda-Turo C, Planell JA, Gil FJ, Aparicio C. Adsorption of fibronectin, fibrinogen, and albumin on TiO₂: time-resolved kinetics, structural changes, and competition study. **Biointerphases** 2012;7:1-13.

Pereira KK, Alves OC, Novaes AB Jr, de Oliveira FS, Yi JH, Zaniquelli O, Wolf-Brandstetter C, Scharnweber D, Variola F, Nanci A, Rosa AL, de Oliveira PT. Progression of osteogenic cell cultures grown on microtopographic titanium coated with calcium phosphate and functionalized with a type I collagen-derived peptide. **J Periodontol** 2013;84:1199-1210.

Polimeni G, Wikesjö UM, Susin C, Qahash M, Shanaman RH, Prasad HS, Rohrer MD, Hall J. Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human growth/differentiation factor-5: histologic observations. **J Clin Periodontol** 2010;8:759-768.

Price RL, Ellison K, Haberstroh KM, Webster TJ. Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. **J Biomed Mater Res A** 2004;70:129-138.

Price RL, Haberstroh KM, Webster TJ. Enhanced functions of osteoblasts on nanostructured surfaces of carbon and alumina. **Med Biol Eng Comput** 2003;41:372-375.

Puckett S, Pareta R, Webster TJ. Nano rough micron patterned titanium for directing osteoblast morphology and adhesion. **Int J Nanomed** 2008;3:229-241.

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. Surface characterization and cell response. **Langmuir** 1999;15:6931-6939.

Richert L, Variola F, Rosei F, Wuest J, Nanci A. Adsorption of proteins on nanoporous Ti surfaces. **Surf Sci** 2010;604:1445-1451.

Richert L, Vetrone F, Yi J-H, Zalzal SF, Wuest JD, Rosei, Nanci A. Surface nanopatterning to control cell growth. **Adv Mater** 2008;15:1-5.

Roessler S, Born R, Scharnweber D, Worch H, Sewing A, Dard M. Biomimetic coatings functionalized with adhesion peptides for dental implants. **J Mater Sci Mater Med** 2001;12:871-877.

Rosa AL, De Oliveira CS, Beloti MM, Xavier SP, De Oliveira PT. Effect of microcapsules containing TAK-778 on bone formation around osseointegrated implants: histomorphometric analysis in dogs. **Implant Dent** 2006;15:97-103.

Rosa AL, Kato RB, Castro Raucci LM, Teixeira LN, de Oliveira FS, Bellesini LS, de Oliveira PT, Hassan MQ, Beloti MM. Nanotopography Drives Stem Cell Fate Toward Osteoblast Differentiation Through $\alpha 1 \beta 1$ Integrin Signaling Pathway. **J Cell Biochem** 2014;11:540-548.

Scharnweber D, Born R, Flade K, Roessler S, Stoelzel M, Worch H. Mineralization behaviour of collagen type I immobilized on different substrates. **Biomaterials** 2004;25:2371-2380.

Schouten C, Meijer GJ, van den Beucken JJ, Spauwen PH, Jansen JA. Effects of implant geometry, surface properties, and TGF- $\beta 1$ on peri-implant bone response: an experimental study in goats. **Clin Oral Implants Res** 2009;20:421-429.

Sela MN, Badihi L, Rosen G, Steinberg D, Kohavi D. Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces. **Clin Oral Implants Res** 2007;18:630-638.

Shekaran A, Garcia AJ. Nanoscale engineering of extracellular matrix-mimetic bioadhesive surfaces and implants for tissue engineering. **Biochim Biophys Acta** 2011;3:350-360.

Siqueira JR Jr, Caseli L, Crespilho FN, Zucolotto V, Oliveira ON Jr. Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing. **Biosens Bioelectron** 2010;25:1254-1263.

Soares MSM. Marcadores da diferenciação osteoblástica em culturas de células crescidas sobre titânio e expostas a coquetel de fatores de crescimento e proteínas. 2014. 66f. (Mestrado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Sousa SR, Moradas-Ferreira P, Barbosa MA. TiO₂ type influences fibronectin adsorption. **J Mater Sci Mater Med** 2005;16:1173-1178.

Sousa SR, Moradas-Ferreira P, Saramago B, Melo LV, Barbosa MA. Human serum albumin adsorption on TiO₂ from single protein solutions and from plasma. **Langmuir** 2004;20:9745-9754.

Sousa SR, Lamghari M, Sampaio P, Moradas-Ferreira P, Barbosa MA. Osteoblast adhesion and morphology on TiO₂ depends on the competitive preadsorption of albumin and fibronectin. **J Biomed Mater Res A** 2008;84:281-290.

Spiro RC, Liu L, Heidaran MA, Thompson AY, Ng CK, Pohl J, Poser JW. Inductive activity of recombinant human growth and differentiation factor-5. **Biochem Soc Trans** 2000;28:362-368.

Sumita Y, Honda MJ, Ueda M, Asahina I, Kagami H. Differential effects of growth differentiation factor-5 on porcine dental papilla- and follicle-derived cells. **Growth Factors** 2010;28:56-65.

Susin C, Qahash M, Polimeni G, Lu PH, Prasad HS, Rohrer MD, Hall J, Wikesjö UM. Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7/rhOP-1): histological observations. **J Clin Periodontol** 2010;37:574-581.

Tavares MG, de Oliveira PT, Nanci A, Hawthorne AC, Rosa AL, Xavier SP. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H₂SO₄/H₂O₂ enhances contact osteogenesis. **Clin Oral Implants Res** 2007;18:452-458.

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.

Variola F, Brunski JB, Orsini G, Tambasco de Oliveira P, Wazen R, Nanci A. Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives. **Nanoscale** 2011;3:335-353.

Variola F, Vetrone F, Richert L, Jedrzejowski P, Yi JH, Zalzal S, Clair S, Sarkissian A, Perepichka DF, Wuest JD, Rosei F, Nanci A. Improving biocompatibility of implantable metals by nanoscale modification of surfaces: an overview of strategies, fabrication methods, and challenges. **Small** 2009;5:996-1006.

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.

Wazen RM, Kuroda S, Nishio C, Sellin K, Brunski JB, Nanci A. Gene expression profiling and histomorphometric analyses of the early bone healing response around nanotextured implants. **Nanomedicine** 2013;8:1385-1395.

Webster TJ, Eijffors JU. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. **Biomaterials** 2004;25:4731-4739.

Webster TJ, Schadler LS, Siegel RW, Bizios R. Mechanisms of enhanced osteoblast adhesion on nanophase alumina involve vitronectin. **Tissue Eng** 2001;7:291-301.

Wikeshö UM, Huang YH, Xiropaidis AV, Sorensen RG, Rohrer MD, Prasad HS, Wozney JM, Hall J. Bone formation at recombinant human bone morphogenetic protein-2-coated titanium implants in the posterior maxilla (Type IV bone) in non-human primates. **J Clin Periodontol** 2008;35:992-1000.

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.

Yang L, Sheldon BW, Webster TJ. The impact of diamond nanocrystallinity on osteoblast functions. **Biomaterials** 2009;30:3458-3465.

Yao C, Slamovich EB, Webster TJ. Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures. **J Biomed Mater Res A** 2008;85:157-166.

Yi J-H, Bernard C, Variola F, Zalzal SF, Wuest JD, Rosei F, Nanci A. Characterization of a bioactive nanotextured surface created by controlled chemical oxidation of titanium. **Surf Sci** 2006;60:4613-4621.

Yoshimoto T, Yamamoto M, Kadomatsu H, Sakoda K, Yonamine Y, Izumi Y. Recombinant human growth/differentiation factor-5 (rhGDF-5) induced bone formation in murine calvariae. **J Periodontal Res** 2006;41:140-147.

Zhong ZM, Chen JT, Zhang Y, Zha DS, Lin ZS, Zhao CY, Xu JC, Li T, Xu ZX. Growth/differentiation factor-5 induces osteogenic differentiation of human ligamentum flavum cells through activation of ERK1/2 and p38 MAPK. **Cell Physiol Biochem** 2010;26:179-186.