UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

EMANUELA PRADO FERRAZ

**SUPERFÍCIES DE TITÂNIO MODIFICADAS POR PLASMA: AVALIAÇÃO *IN*
VITRO EM CULTURA DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS**

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

EMANUELA PRADO FERRAZ

SUPERFÍCIES DE TITÂNIO MODIFICADAS POR PLASMA: AVALIAÇÃO *IN VITRO* EM CULTURA DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS

Dissertação apresentada ao Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

Ribeirão Preto

2012

Autorizo a reprodução e a divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Ferraz, Emanuela Prado

Superfícies de titânio modificadas por plasma: avaliação *in vitro* em cultura de células osteoblásticas. Ribeirão Preto, 2012.

66p. : il. ; 30cm

Dissertação apresentada ao Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Rosa, Adalberto Luiz

1. Osseointegração 2. Nitretação 3. Cultura de células 4. Titânio

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ferraz, Emanuela Prado

Superfícies de titânio modificadas por plasma: avaliação *in vitro* em cultura de células osteoblásticas

Dissertação apresentada ao Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

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

Aos meus pais, Mara e Antônio, pelo amor e
apoio incondicionais

AGRADECIMENTOS

Desenvolver uma pesquisa não é um trabalho solitário. Isaac Newton já escrevia sobre o fardo que impomos aos ombros de gigantes que nos precedem. E eu tive o imenso prazer de trabalhar rodeada de gigantes. Sem o esforço, a paciência, a cooperação e o crédito de todos, essas páginas ficariam em branco. Divido com vocês o meu sucesso, que nada tem a ver com os resultados obtidos nessa pesquisa particular. Me sinto vitoriosa por ter tido a oportunidade de viver e aprender com todos vocês, e mais do que isso, por ter a sua amizade.

Ao Professor Dr. Adalberto Luiz Rosa,

Gigante. Indivíduo de personalidade ímpar, com quem tive a feliz oportunidade e imenso prazer em conviver nos últimos 2 anos. E por quem minha admiração cresce a cada dia. Espero ter correspondido às suas expectativas. À você minha gratidão e sincera amizade.

Ao Professor Dr. Marcio Mateus Beloti,

Gigante. Teria sido um grande cirurgião se não fosse um excelente pesquisador. Sinto-me orgulhosa por ter acompanhado, mesmo de longe, as suas conquistas. Saiba que lhe respeito muito e, mais do que um professor, o tenho como um grande amigo e um grande exemplo a ser seguido.

Ao Professor Paulo Tambasco de Oliveira,

Gigante. Sempre correndo contra o tempo, nunca deixou de me prestar ajuda. Muito obrigada.

Aos Professores de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto: Waldemar M. R. Barros, Luis A. Salata, Cássio E. Sverzut, Samuel P. Xavier, Alexandre E. Trivellato,

Gigantes. Responsáveis pela minha paixão pela Cirurgia-Buco-Maxilo-Facial. Não tenho palavras para agradecer por todos esses anos de convívio, por tudo o que me ensinam e por todas as portas abertas.

Aos professores da Periodontia Artur B. de Novaes Jr, Sérgio L. S. de Souza, Daniela B. Palioto, Márcio M. Grisi, Mário Taba Jr e Michel R. Messoria,

Gigantes. Meus mestres na graduação. Obrigada pela convivência sempre harmoniosa

Às queridas Dulce, Tatiana, Rosângela, D. Divina,

Gigantes. Sempre prontas para resolver qualquer problema. Sem vocês, nada funcionaria.

Aos meus grandes amigos Roger, Fabíola, Larissa Sverzut, Alex, Larissa Castro, Lucas

Gigantes. Me ensinaram tudo, me ajudaram sempre. Amizade que foi além da bancada do laboratório. Vocês estarão sempre no meu coração.

Aos colegas dos curso de Mestrado em Cirurgia e Periodontia da FORP-USP:

Gigantes. André, Antonio, Darkilson, Fernando, Gustavo, Marcus e Willian. Cada um seguiu o seu caminho. Que sejam felizes em suas escolhas. Sucesso e boa sorte.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro durante a realização desse projeto.

Ao Rogério,

Gigante. Dono de um sorriso constante e contagiante. Sempre com uma palavra de incentivo e apoio. Obrigada acreditar que tudo sempre vai dar certo. Amo você.

À minha família: Mara, Antonio, Thiago, Andrea, Felipe e Alice

Gigantes. Obrigada por depositarem em mim a confiança para todas as horas. Obrigada por sempre apoiarem minhas decisões, por mais insanas que possam parecer. Sei que se orgulham de mim, e esse orgulho é que me faz continuar a lutar pelo meu objetivo. Amo muito todos vocês.

Àqueles com quem tive a oportunidade de conhecer e conviver nesses 12 anos de profissão e milhares de quilômetros rodados e que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional. Não vou citar o nome de cada um para não cometer a injustiça de esquecer alguém. Todos são especiais, mesmo aquelas cujo contato foi perdido pelo tempo ou pela distância. A todos vocês, muito obrigada por acreditarem.

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

FERRAZ, EP. **Superfícies de titânio modificadas por plasma: avaliação *in vitro* em cultura de células osteoblásticas.** Dissertação (Mestrado). Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2012. 66 f.

As pesquisas na área da implantologia têm buscado desenvolver superfícies que acelerem o processo de osseointegração adjacente ao implante, permitindo a reabilitação funcional e estética precoce. Modificações da topografia e composição química têm sido propostas com o objetivo de modular as funções celulares na interface do tecido ósseo com o implante e, em última análise, aumentar o contato osso-implante. A deposição iônica por plasma é uma modalidade de tratamento utilizada em implantes ortopédicos. Na odontologia, estudos têm avaliado o efeito das diferentes técnicas de nitretação de superfícies de titânio (Ti) sobre eventos iniciais da osseointegração, como a adesão celular, mas não sobre eventos tardios. O presente estudo avaliou o efeito de superfícies de Ti modificadas por deposição iônica por plasma, pelas técnicas de nitretação por cátodo oco, por 1 e 3 h, e nitretação planar, nas expressões do fenótipo e gênica de osteoblastos derivados de osso alveolar de humanos e de calvária de ratos. Foram realizadas análises de morfologia, adesão e espraçamento celular, síntese e atividade de fosfatase alcalina (ALP), mineralização da matriz extracelular e expressão de genes marcadores do fenótipo osteoblástico. A adesão celular e a atividade de ALP, foram maiores nas superfícies de Ti tratadas comparadas à superfície sem tratamento (controle), enquanto a proliferação celular e a produção de matriz mineralizada não apresentaram diferenças estatisticamente significante entre os grupos. Ainda, as superfícies de Ti tratadas aumentaram a expressão gênica de *ALP* e diminuíram a de osteocalcina (*OC*) quando comparadas à superfície controle. Os resultados sugerem que a deposição iônica por plasma pelas técnicas de nitretação avaliadas modifica as características físico-químicas da superfície de Ti e promove atraso e aumento da diferenciação osteoblástica quando comparada à superfície de Ti não tratada.

Palavras-chave: Osseointegração; Nitretação; Cultura de células; Titânio

ABSTRACT

FERRAZ, EP. **Titanium surfaces modified by plasma: *in vitro* evaluation in osteoblastic cell cultures.** Thesis (Master's Degree). Ribeirão Preto: School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2012. 66 f.

A current goal in implantology research has been the development of titanium surfaces to enhance the process of osseointegration, allowing functional and aesthetic rehabilitation. Modifications on topography and chemical composition have been proposed in order to regulate cell functions of the osteoblasts in contact with the implant surface and ultimately increase the bone-to-implant contact. Plasma ionic deposition is a treatment usually employed in orthopedic implants and in dentistry some studies have shown that different nitriding techniques of titanium (Ti) surfaces may affect the initial events of osseointegration, such as cell adhesion, without evaluating the late ones. This study evaluated the effect of Ti surfaces modified by plasma nitriding combined with hollow cathode, during 1 and 3 h, and planar nitriding, on the phenotype and gene expression of osteoblasts derived from human alveolar bone and newborn rat calvaria. Cell morphology, adhesion and spreading, alkaline phosphatase (ALP) activity and synthesis, extracellular matrix mineralization and gene expression of bone markers were performed. The cell adhesion and ALP activity were higher on treated Ti surfaces compared with untreated (control) ones, while cell proliferation and extracellular matrix mineralization were not affected by the treatments. Also, compared with control Ti surface, the treated ones increased the gene expression of *ALP* and reduced osteocalcin (*OC*). The results suggest that the plasma ionic deposition by nitriding technique modifies the physicochemical features of the Ti surface and promotes a delay and a enhancement of the osteoblastic differentiation compared with untreated Ti surface.

Keywords: Osseointegration; Nitriding; Cell culture; Titanium

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de tratamento das superfícies dos discos de Ti	27
Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de genes marcadores do fenótipo osteoblástico de células osteoblásticas humanas.....	39
Tabela 3. Valores das medidas de rugosidade (Ra e Rq) das superfícies de Ti controle e tratadas.....	42
Tabela 4. Porcentagem relativa dos elementos químicos presentes nas superfícies de Ti controle e tratadas	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática das etapas envolvidas na osseointegração de implantes de Ti. A: Camada de passivação composta por TiO_2 formada sobre a superfície do implante de Ti. B: Moléculas de H_2O e íons Na^+ e Cl^- presentes no sangue, circundando a camada superficial. C: Moléculas de H_2O incorporadas à superfície e íons hidratados; aproximação de moléculas de glicoproteína presentes nos fluidos adjacentes. D: Camada glicoproteica formada interagindo com a membrana celular via receptor. E: Contato direto entre implante de Ti e tecido. Adaptado de Kasemo e Gold (1999) 19
- Figura 2.** Representação esquemática do reator utilizado no processo de tratamento com plasma. Adaptado de Sá (2009) 23
- Figura 3.** Representação esquemática da modificação da camada de passivação da superfície de Ti após o tratamento com plasma. A: Partículas de TiO_2 bombardeadas por partículas do plasma. B: *Sputtering* das partículas de TiO_2 . C: Partículas de TiO_2 que sofreram *sputtering* e partículas do plasma. D: Redeposição das partículas, e a nova superfície obtida. Adaptado de Sá (2009) 23
- Figura 4.** Representação esquemática da amostra acondicionada entre duas superfícies catódicas (Cátodo oco). Adaptado de Sá (2009) 24
- Figura 5.** Aspectos macroscópicos dos discos de Ti controle e tratados 40
- Figura 6.** Fotomicrografias das superfícies de Ti controle e tratadas, obtidas por MEV (A-L) e MFA (M-P). As colunas representam os grupos Controle (A, E, I, M), C.Oco 3h (B, F, J, N), C. Oco 1h (C, G, K, O) e Planar (D, H, L, P). As três primeiras linhas representam os diferentes aumentos da MEV: 1.000x (A-D), 5.000x (E-H) e 20.000x (I-L). Barra: A-D = 50 μm ; E-H = 10 μm ; I-L = 2,5 μm 41
- Figura 7.** Morfologia das células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano, cultivadas por 2 h (A-D) e 24 h (E-H) nas superfícies de Ti Controle (A e E), C.Oco 3h (C e F), C. Oco 1h (E e G) e Planar (D e H). Marcação por fluorescência direta do citoesqueleto de actina (faloidina) e núcleo (DAPI) dos osteoblastos. Barra A-D = 100 μm ; E-H = 50 μm . Aumento 40x 44
- Figura 8.** Número de células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano aderidas às diferentes superfícies de Ti após 2 h (n=10) e 24 h (n=5) de cultivo. Áreas das células osteoblásticas cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti após 2 h de cultivo (n=40). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão 45

Figura 9. Proliferação de células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti, aos 7 e 10 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).....	46
Figura 10. Imunofluorescência indireta para localização da ALP produzida pelas células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano cultivadas por 10 dias nas diferentes superfícies de Ti. Aumento 40x. Barra: 50	47
Figura 11. Atividade de ALP (expressa como μ mol de timolftaleína/h/mg de proteína total) das células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano, cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti, aos 10 e 14 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5)	48
Figura 12. Nódulos de matriz mineralizada produzidos por células osteoblásticas derivadas de calvária de ratos recém-nascidos, cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti, aos 14 dias.....	49
Figura 13. Matriz mineralizada produzida por células osteoblásticas derivadas de calvária de ratos recém-nascidos e cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti, aos 14 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5)	49
Figura 14. Expressão dos genes marcadores do fenótipo osteoblástico (<i>RUNX2</i> , <i>ALP</i> e <i>OC</i>) das células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti, aos 10 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo, ACTB, e calibrados em relação ao controle. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3)	50

LISTAS DE SÍMBOLOS E SIGLAS

C	grau(s) Celsius
mbar	milibar
cm	centímetro(s)
mm	milímetro(s)
μm	micrômetro(s)
nm	nanômetro(s)
h	hora(s)
min	minuto(s)
s	segundo(s)
mg	miligrama(s)
μg	micrograma(s)
mL	mililitro(s)
μL	microlitro(s)
M	molar
mM	milimolar
μmol	micromol
N	normal
rpm	rotação(ões) por minuto
kV	kilovoltagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. PROPOSIÇÃO	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Amostras de Ti.....	27
3.2 Caracterização das superfícies dos discos de Ti.....	28
3.2.1 <i>Análise de topografia e rugosidade</i>	28
3.2.2 <i>Análise dos elementos químicos</i>	29
3.3 Cultura de células	29
3.3.1 <i>Cultura de células osteoblásticas de osso alveolar humano</i>	29
3.3.2 <i>Cultura de células osteoblásticas de calvária de ratos recém-nascidos</i> ...	31
3.4 Avaliação das respostas celulares.....	32
3.4.1 <i>Morfologia celular por fluorescência direta</i>	32
3.4.2 <i>Adesão e espraiamento celular</i>	32
3.4.3 <i>Proliferação celular</i>	33
3.4.4 <i>Imunofluorescência indireta para localização da ALP</i>	33
3.4.5 <i>Medida da atividade de ALP</i>	34
3.4.6 <i>Deteção e quantificação da formação de nódulos de matriz extracelular mineralizada</i>	35
3.4.7 <i>Análise da expressão de genes marcadores do fenótipo osteoblástico</i>	36
3.4.7.1 <i>Extração e quantificação de RNA total para PCR em tempo real</i>	36
3.4.7.2 <i>Confecção da fita de cDNA</i>	37
3.4.7.3 <i>PCR em tempo real</i>	38
3.5 Análise estatística	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1 Caracterização das superfícies dos discos de Ti.....	40
4.1.1 <i>Análise da topografia e rugosidade</i>	40
4.1.2 <i>Análise dos elementos químicos</i>	42
4.2 Avaliação das respostas celulares.....	43
4.2.1 <i>Morfologia celular por fluorescência direta</i>	43

4.2.2 Adesão e espraiamento celular.....	45
4.2.3 Proliferação celular.....	46
4.2.4 Imunofluorescência indireta para localização da ALP.....	47
4.2.5 Medida da atividade de ALP	48
4.2.6 Detecção e quantificação da formação de nódulos de matriz extracelular mineralizada	49
4.2.7 Análise da expressão dos genes marcadores do fenótipo osteoblástico....	50
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

A reabilitação funcional e estética de pacientes parcial ou totalmente edêntulos com implantes osseointegráveis e próteses sobre implantes representa um grande avanço na odontologia. Trata-se de uma opção de tratamento que apresenta resultados seguros, previsíveis e com altas taxas de sucesso, desde que adequadamente indicada e criteriosamente realizada (Van Steenberghe *et al.*, 1990; Wennerberg, Albrektsson, 2011).

Desde o final da década de sessenta, o material de escolha para a confecção dos implantes é o titânio (Ti), comercialmente puro (cpTi) ou associado a outros metais na forma de ligas, por ser um material com propriedades mecânicas que suportam a carga funcional da mastigação e, ao mesmo tempo, biocompatível com o tecido ósseo. Desta última propriedade resulta sua capacidade de osseointegração, definida por Brånemark *et al.* (1985) como “o contato direto, estrutural e funcional, entre o tecido ósseo, organizado e saudável, e a superfície do implante”, e atualizada por Zarb e Albrektsson (1991) como “o processo no qual há uma fixação rígida assintomática entre o material aloplástico e o tecido ósseo durante aplicação de carga”.

A osseointegração é um fenômeno biológico resultante do processo de osteogênese que ocorre na interface osso-implante, envolvendo eventos celulares e extracelulares como o recrutamento, a proliferação de células precursoras mesenquimais, osteoprogenitoras e pré-osteoblásticas e a diferenciação destas em osteoblastos, com consequente produção de matriz mineralizada (Schwartz, Boyan, 1994).

A superfície do implante de Ti ao entrar em contato com o ar forma uma camada de óxido de Ti, principalmente TiO_2 (Figura 1A), denominada camada de passivação e que confere a esse metal resistência à corrosão (Sul *et al.*, 2001). O TiO_2 é altamente polar, o que favorece a adsorção de água (H_2O) e moléculas solúveis em H_2O , evento que caracteriza o início do processo de osseointegração, como descrito a seguir. Imediatamente após a instalação do implante de Ti, há adsorção de moléculas de H_2O cujo arranjo específico depende de características da superfície na escala atômica, caracterizando-a como hidrofílica ou hidrofóbica. Formada a camada de H_2O , íons sódio e cloro (Na^+ e Cl^-) são incorporados e hidratados, e biomoléculas, principalmente glicoproteínas provenientes do sangue e adjacentes ao alvéolo cirúrgico recém-criado, são adsorvidas. Forma-se assim uma camada glicoproteica de 2 a 5 μm de espessura, à qual as células se aderem e interagem, iniciando uma série de reações que culminará com a liberação de citocinas e fatores de crescimento, responsáveis pela modulação da atividade celular circunjacente (Figura 1 B-D) (Davies, 1998; Kasemo, Gold, 1999). Desse modo, a interação inicial entre as moléculas e o substrato está diretamente relacionada com a resposta celular, ou seja, as propriedades da superfície do implante de Ti proporcionam uma maior ou menor interação com a H_2O e influenciam as reações subsequentes. Apesar do complexo padrão de reparação tecidual envolvido no processo de osseointegração não ser totalmente entendido (Schwarz *et al.*, 2009), existe um consenso na literatura de que as superfícies dos implantes de Ti desempenham papel crítico nessas interações e determinam, em parte, a resposta biológica (Lacefield, 1999; Zhao *et al.*, 2011).

Figura 1. Representação esquemática das etapas envolvidas na osseointegração de implantes de Ti. A: Camada de passivação composta por TiO_2 formada sobre a superfície do implante de Ti. B: Moléculas de H_2O e íons Na^+ e Cl^- presentes no sangue, circundando a camada superficial. C: Moléculas de H_2O incorporadas à superfície e íons hidratados; aproximação de moléculas de glicoproteína presentes nos fluidos adjacentes. D: Camada glicoproteica formada interagindo com a membrana celular via receptor. E: Contato direto entre implante de Ti e tecido. Adaptado de Kasemo e Gold (1999).

Numerosos estudos realizados *in vitro* e *in vivo* (Albrektsson *et al.*, 1981; Smith, Zarb, 1989; Albrektsson, Johansson, 1991; Schwartz, Boyan, 1994; Sennerby, Roos, 1998; Sykaras *et al.*, 2000; Wennerberg, Albrektsson, 2009; Olivares-Navarrete *et al.*, 2011) demonstram que os eventos que ocorrem na interface osso-implante de Ti determinam um maior ou menor contato ósseo e portanto interferem na estabilidade durante o processo de reparo, e que esses eventos são influenciados por uma série de fatores, como: (1) variáveis clínicas dos pacientes e anatomia da região onde será colocado o implante, (2) técnica cirúrgica e experiência do profissional, (3) momento e tipo de aplicação de carga ao implante, e (4) morfologia, topografia, rugosidade e química da superfície dos implantes.

Com relação às características dos implantes de Ti, por muitos anos os implantes sem qualquer tratamento de superfície (usinados), foram considerados como o padrão ouro, com elevadas taxas de sucesso demonstradas em diversos estudos clínicos de longo prazo (Jemt, 1994; Friberg *et al.*, 1997; Jemt *et al.*, 2002; Attard, Zarb, 2004; Jemt, Johansson, 2006; Wennerberg, Albrektsson, 2011). O aumento da procura dessa modalidade de tratamento fez com que este passasse a ser indicado em situações clínicas diversas, e modificações nas superfícies dos implantes de Ti passaram a ser desenvolvidas (Klein *et al.*, 2011). Dentre as situações que incitaram a busca por diferentes superfícies encontram-se: (1) a reabilitação com implantes de Ti em regiões de osso tipo I ou IV (Lekholm, Zarb, 1985), que representam os extremos em relação à presença de osso cortical e medular, (2) a instalação de implantes de Ti em regiões com quantidade óssea limitada, como em região posterior de maxila e mandíbula, edêntulas por longos períodos, onde seria necessário procedimento cirúrgico adicional para reconstrução óssea, como por exemplo, enxertos ósseos e (3) a necessidade de aplicação de cargas o mais precocemente possível, sem perturbar a fisiologia do reparo.

Para contornar essas situações, com o objetivo de aumentar o contato osso-implante e acelerar o processo de osseointegração, foram desenvolvidos implantes de Ti com superfícies modificadas por diversos tipos de tratamento, baseados em resultados experimentais que sugerem que esses implantes de Ti podem suportar carga mais precocemente por apresentarem melhor estabilidade mecânica primária, maior retenção de coágulo e por estimularem a reparação óssea (Wennerberg *et al.*, 2003; Klein *et al.*, 2011). Puleo e Nanci (1999) descrevem que as superfícies podem ser tratadas por diferentes métodos: físico-químicos (quando há modificação da energia de superfície e composição química), morfológicos (modificações na

macroestrutura e rugosidade) e bioquímicos (modificações que produzem efeitos químicos e morfológicos).

A relação entre modificações de propriedades específicas da superfície dos implantes de Ti (topografia, rugosidade e composição química) e a resposta do tecido ósseo, tem sido abordada em diversos estudos (Rosa, Beloti, 2003; Le Guehennec *et al.*, 2008; Wennerberg, Albrektsson, 2009; Lai *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011). Já está estabelecido na literatura que essas modificações da superfície do Ti irão promover alterações na interação célula-biomaterial (Puleo, Nanci, 1999; Brunski *et al.*, 2000; Anselme, 2000; De Oliveira, Nanci, 2004; Le Guehennec *et al.*, 2008; Schwartz F^o *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2009; Wennerberg, Albrektsson, 2009; Klein *et al.*, 2011). Entretanto, a maneira como as modificações da superfície do Ti irão afetar os diferentes estágios da osseointegração ainda não está totalmente elucidada e os dados da literatura se mostram controversos (Mendonça *et al.*, 2009; Wennerberg, Albrektsson, 2010). Além disso, não é possível atribuir uma resposta biológica à modificação de uma propriedade específica da superfície do Ti, uma vez que elas não ocorrem separadamente; por exemplo, alterações na rugosidade da superfície do Ti poderão induzir modificações químicas dessa superfície (Meirelles *et al.*, 2008; Lang *et al.*, 2009; Pareta *et al.*, 2010).

A técnica que utiliza o plasma para modificar superfícies de implantes de quadril, joelho, ombro e tornozelo, foi proposta com o objetivo de aumentar a resistência à abrasão e reduzir a colonização bacteriana (Hahn, Palich, 1970; Groessner-Schreiber, 2003). Entre as vantagens dessa técnica estão a limpeza da superfície do biomaterial, o melhor controle e uniformidade da espessura da camada de passivação, a utilização de baixas temperaturas (em relação ao ponto de fusão do Ti) que não comprometem as propriedades intrínsecas do biomaterial, a não

poluição do ambiente, o tempo de tratamento reduzido e o baixo custo (Chu *et al.*, 2002; Alves Jr. *et al.*, 2005; Sá, 2009; Coelho *et al.*, 2012).

O plasma é frequentemente tido como o quarto estado da matéria, produzido por diferentes fontes e aplicado para modificação da superfície de diversos materiais por várias técnicas (Chu *et al.*, 2002; Coelho *et al.*, 2012). A técnica selecionada para esse estudo foi a deposição iônica por plasma, que é um gás (oxigênio - O₂, nitrogênio - N₂, hidrogênio - H₂, argônio - Ar), contendo partículas livres compostas por espécies neutras e eletricamente carregadas (moléculas, átomos, elétrons e íons), em equilíbrio termodinâmico e eletricamente neutro. As partículas livres no plasma movem-se em resposta à qualquer campo elétrico, com o objetivo de neutralizá-lo. Portanto, se um potencial elétrico é gerado na atmosfera do plasma, as partículas livres se moverão formando uma blindagem elétrica (Sá, 2009). A produção do plasma ocorre a partir do confinamento do gás em um sistema hermeticamente fechado com 2 eletrodos nas extremidades, com pressão e temperatura controladas. Cria-se uma diferença de potencial nos eletrodos, os íons e elétrons são acelerados e colidem com outras partículas do plasma, gerando mais partículas livres. O material a ser tratado é colocado dentro desse sistema (Figura 2) e os seguintes eventos ocorrem: (1) aquecimento das partículas livres, com consequente vibração; essas partículas irão bombardear a camada superficial do material, (2) ejeção de átomos da superfície por transferência gerada pela colisão primária ou em cascata (*sputtering*), (3) redeposição de espécies que sofreram *sputtering* pela recombinação com as partículas presentes no plasma e (4) eventualmente a implantação das partículas na superfície do material, criando defeitos (Figura 3 A-D).

Figura 2. Representação esquemática do reator utilizado no processo de tratamento com plasma. Adaptado de Sá (2009).

Figura 3. Representação esquemática da modificação da camada de passivação da superfície de Ti após o tratamento com plasma. A: Partículas de TiO_2 bombardeadas por partículas do plasma. B: *Sputtering* das partículas de TiO_2 . C: Partículas de TiO_2 que sofreram *sputtering* e partículas do plasma. D: Redeposição das partículas, e a nova superfície obtida. Adaptado de Sá (2009).

O tratamento é denominado nitretação quando o plasma é composto pela combinação de N_2 e H_2 . A composição do gás, temperatura e pressão afetam as alterações da superfície. Alves Jr. *et al.* (2005) concluíram que a concentração ótima para que haja alteração química da superfície com deposição de nitreto de titânio (TiN) é de 20% N_2 e 80% de H_2 , e que as condições ideais de temperatura e pressão são respectivamente de 450 °C e 1,5 mbar. A camada de TiN é conhecida por conferir ao material as vantagens previamente citadas como: aumento das propriedades mecânicas, excelente biocompatibilidade e estabilidade química, proporcionando aumento na resistência à corrosão (Park *et al.*, 2003).

A nitretação pode ocorrer por diferentes métodos, dependendo da disposição das amostras no sistema. Os métodos selecionados para esse estudo foram a nitretação por cátodo oco e planar. Na técnica de nitretação planar, a amostra é apoiada no porta amostra (Figura 2) e o *sputtering* se dá diretamente sobre a superfície. Na técnica de nitretação por cátodo oco, a amostra é apoiada no porta amostra e coberta por uma outra superfície catódica com pernas de 9 mm de altura (Figura 4). Desse modo há uma diminuição do espaço de movimentação das partículas ionizadas, aumentando o movimento de zig-zag dessas e a incidência energética, culminando em maior alteração superficial.

Figura 4. Representação esquemática da amostra acondicionada entre duas superfícies catódicas (Cátodo oco). Adaptado de Sá (2009).

Superfícies de Ti tratadas por nitretação por cátodo oco e planar apresentaram diferentes rugosidades, microdureza e molhabilidade e, em uma avaliação preliminar, possibilitaram maior proliferação e adesão de células tronco derivadas de sangue de cordão umbilical, em comparação com superfícies de Ti não modificadas (Sá, 2009). No entanto, várias respostas biológicas *in vitro*, incluindo a influência sobre células osteoblásticas e a expressão do fenótipo osteoblástico, ainda necessitam ser avaliadas para determinar se essas modificações podem representar boas alternativas para melhorar a osseointegração de implantes de Ti.

Investigações sobre a influência dos tratamentos de superfície do Ti na expressão gênica e no fenótipo osteoblástico podem ser realizadas a partir de cultura de células osteoblásticas, como amplamente estudado pelo nosso grupo (Rosa, Beloti, 2003; Faria *et al.*, 2003; Canabarro *et al.*, 2008; Bombonato-Prado *et al.*, 2009; Franco *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2009; Assis *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2010; Bueno *et al.*, 2011; Teixeira *et al.*, 2012). O modelo experimental *in vitro* permite avaliações detalhadas de eventos celulares em diferentes fases do desenvolvimento da cultura como adesão e espraiamento e proliferação celular, diferenciação e síntese protéica, e em condições controladas pelos pesquisadores (Bachle, Kohal, 2004). A escolha de células derivadas de osso alveolar humano baseia-se no fato desse tecido ser um dos mais ativos do corpo humano, em constante deposição e reabsorção, e por apresentar células osteoblásticas que irão interagir diretamente com as superfícies dos implantes (Xiao *et al.*, 2003), refletindo de maneira mais próxima as situações *in vivo* (Variola *et al.*, 2012). Para os ensaios de mineralização optou-se pela utilização de células osteoblásticas derivadas de calvária de ratos recém-nascidos por sabidamente produzirem maior quantidade de matriz extracelular mineralizada (Aubin *et al.*, 1995).

2. PROPOSIÇÃO

Objetivo geral: Avaliar as respostas *in vitro* de células osteoblásticas às superfícies de discos de Ti modificadas por deposição iônica por plasma, por meio de duas técnicas de nitretação: cátodo oco e planar.

Objetivos específicos:

1. Avaliar as modificações de topografia e química da superfície de Ti provocadas pelo tratamento por duas diferentes técnicas de nitretação, cátodo oco e planar.

2. Avaliar em cultura de células osteoblásticas o efeito das modificações da superfície de Ti provocadas pelo tratamento por duas diferentes técnicas de nitretação, cátodo oco e planar, sobre: morfologia, adesão, espraio e proliferação celular, imunolocalização e atividade de fosfatase alcalina (ALP), formação de matriz extracelular mineralizada e expressão de genes marcadores do fenótipo osteoblástico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de Ti

Foram utilizados discos de cpTi, grau II, medindo 15 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura. As amostras foram lixadas com lixas de carbetto de silício (80-2000) e polidas com uma solução de sílica coloidal, e peróxido de hidrogênio, em um pano de polimento OP-CHEM por 30 min. Em acordo com o protocolo de limpeza, os discos foram submersos em detergente enzimático (Merck, HE, Alemanha) por 10 min, seguido de 10 min em H₂O e 10 min em álcool 70% (concentração obtida a partir do álcool absoluto 100%, Merck), sob agitação constante em aparelho de ultrassom (Odontobras, RP, Brasil). Posteriormente, os discos de Ti foram divididos em quatro grupos: os discos de Ti do grupo Controle foram mantidos sem tratamento e os outros três grupos de discos de Ti foram submetidos a um dos tratamentos mostrados na Tabela 1. Todos os tratamentos foram realizados no Laboratório de Processamento de Plasma sob a supervisão do Professor Doutor Clodomiro Alves Júnior na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), como descrito por Sá (2009).

Tabela 1. Condições de tratamento das superfícies dos discos de Ti.

	Sem tratamento (Controle)	Nitretação por cátodo oco (C.Oco 3h)	Nitretação por cátodo oco (C.Oco 1h)	Nitretação planar (Planar)
Gases	-	20% N ₂ 80% H ₂	20% N ₂ 80% H ₂	20% N ₂ 80% H ₂
Temperatura (°C)	-	450	450	450
Tempo (h)	-	3	1	1
Pressão (mbar)	-	1,5	1,5	1,5

Todos os discos de Ti foram individualmente acondicionados em grau cirúrgico e submetidos à esterilização em autoclave (Tuttnauer, NY, EUA). Previamente ao plaqueamento das células, os discos de Ti foram transferidos para placas estéreis de 24 poços (Corning Incorporated, NY, EUA) com ajuda de pinça estéril de Ti.

3.2 Caracterização das superfícies dos discos de Ti

3.2.1 Análise de topografia e rugosidade

As análises de topografia e rugosidade das superfícies dos discos de Ti foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (MFA).

Para as análises por meio de MEV foi utilizado o microscópio modelo Inspect S50 (FEI Company, OR, EUA), operando em 25 Kv. A rugosidade foi avaliada por MFA, utilizando o microscópio modelo NanoScope V (Digital Instruments, NY, EUA). Foram selecionadas áreas de $10 \mu\text{m}^2$ e as imagens foram analisadas no programa NanoScope Analysis v1.20 (Digital Instruments), que possibilitou a caracterização das superfícies quanto à forma e ondulação. O programa produziu imagens tridimensionais e dois parâmetros numéricos de rugosidade, Ra e Rq. O Ra representa a média aritmética do somatório dos valores absolutos das ordenadas em relação à linha média. O Rq é o valor da raiz quadrada da média dos valores dos quadrados das ordenadas do perfil (ou média quadrática), em relação à linha média. É um parâmetro aplicado para determinar se os picos e vales comprometem ou distorcem as imagens (Oliveira, 2004).

3.2.2 Análise dos elementos químicos

A avaliação da composição química das superfícies dos discos de Ti foi realizada no LCE da UFSCar, por análise de energia dispersiva de elétrons de raios-X (EDS), acoplada ao MEV. Essa análise permite que seja determinada a porcentagem relativa, em peso, dos diferentes elementos químicos presentes nas superfícies.

3.3 Cultura de células

Foram utilizados dois tipos de culturas primárias de células osteoblásticas. Células humanas obtidas de fragmentos de osso do processo alveolar, descartados durante procedimentos cirúrgicos para extração dentária em pacientes saudáveis, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). Células de ratos foram obtidas de calvárias de ratos Wistar recém-nascidos, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do *Campus* de Ribeirão Preto da USP.

3.3.1 Cultura de células osteoblásticas de osso alveolar humano

As células obtidas de fragmentos de osso alveolar foram isoladas e cultivadas de acordo com o método descrito por Beloti *et al.* (2006). Os fragmentos de tecido ósseo foram submetidos a seis digestões enzimáticas sequenciais em tubos de centrífuga estéreis contendo solução de collagenase tipo II (Gibco, Invitrogen, NY, EUA) a 1 mg/mL, por períodos de 30 min a 37 °C, sob agitação constante. Os sobrenadantes 1 e 2 foram desprezados e os das quatro últimas digestões, transferidos para tubo de centrífuga contendo 10 mL de meio de cultura total

suplementado (MTS) composto por meio essencial mínimo modificação alfa (α -MEM; Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 20 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Gibco), 10^{-7} M dexametasona (Sigma, MO, EUA), 0,3 $\mu\text{g/mL}$ de fungizona (Gibco), 5 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico (Sigma) e 7 mM de β -glicerofosfato (Sigma) e centrifugados a 2000 rpm por 5 min (Eppendorf AG, HA, Alemanha). O meio foi removido e as células isoladas e os fragmentos ósseos remanescentes foram ressuspensos em 5 mL de meio fresco. A solução foi transferida para uma garrafa de cultura de 75 cm^2 (Corning Incorporated) e completado com o mesmo meio até o volume final de 20 mL. A evolução das culturas foi acompanhada em microscópio de fase invertido Axiovert 25 (Zeiss, TU, Alemanha). Na subconfluência da cultura primária, o meio de cultura foi removido e adicionado 9,5 mL de solução de tripsina a 0,25% (Gibco) e 500 μL de EDTA a 1 mM (Gibco) para obtenção de suspensão de células. Em seguida, as células foram contadas no hemocitômetro (Fisher Scientific, PA, EUA) e determinado o volume necessário para o plaqueamento na densidade de 2×10^4 células/poço sobre os discos de Ti previamente dispostos em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Incorporated), contendo 1,8 mL de MTS. As culturas foram mantidas por períodos de até 14 dias e a progressão avaliada em poços sem a presença de discos, em microscópio de fase invertido (Zeiss). Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas em incubadora (Sanyo Electric Co., OS, Japão) a 37 °C e atmosfera umidificada contendo 5% de gás carbônico (CO_2) e 95% de ar atmosférico e o meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Essas células foram utilizadas para a realização das seguintes avaliações: morfologia por fluorescência direta ao final de 2 h e 24 h, adesão ao final de 2 h e 24 h, espraçamento ao final de 2 h, proliferação aos 7 e 10 dias, imunofluorescência indireta para localização de ALP aos 10 dias, atividade de

ALP aos 10 e 14 dias, e análise da expressão de genes marcadores do fenótipo osteoblástico por PCR (da sigla em inglês para *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real aos 10 dias.

3.3.2 Cultura de células osteoblásticas de calvária de ratos recém-nascidos

As células foram isoladas por digestão enzimática de fragmentos de calvárias de ratos Wistar recém-nascidos, com 2 a 4 dias de vida (De Oliveira *et al.*, 2003). Os fragmentos das calvárias removidas foram submetidos a três digestões enzimáticas sequenciais com solução de tripsina 0,25% (Gibco) e 1 mg/mL de collagenase tipo II (Gibco) a 37 °C por 5, 15 e 25 min, respectivamente. O sobrenadante da primeira digestão foi desprezado e aqueles das duas últimas digestões agrupados e centrifugados a 2000 rpm (Eppendorf AG) por 5 min. As células isoladas foram ressuspensas em α -MEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Sigma), 7 mM de β -glicerofosfato (Sigma) e 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco). As células foram contadas no hemocítômetro (Fisher Scientific) e plaqueadas na densidade de 2×10^4 células/poço sobre os discos de Ti previamente dispostos em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Incorporated), contendo 1 mL do mesmo meio. As culturas foram mantidas por 14 dias e a progressão avaliada em poços sem a presença de discos, em microscópio de fase invertido (Zeiss). Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas em incubadora (Sanyo Electric Co.) a 37 °C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico e o meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Essas células foram utilizadas para a avaliação da formação de matriz extracelular mineralizada.

3.4 Avaliação das respostas celulares

3.4.1 Morfologia celular por fluorescência direta

Para avaliação da morfologia celular, ao final de 2 h e 24 h, as células cultivadas sobre um disco de cada grupo foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% (Labsynth, SP, Brasil) em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,2, por 10 min à temperatura ambiente. A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 (Acros Organics, NY, EUA) 0,5% em PB, durante 10 min. Para visualização das membranas e núcleos celulares foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen, OR, EUA) 1:200, e *4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride* (DAPI, Molecular Probes) 300 nM. Após montagem de lâminula de vidro (Fisherbrand, PA, EUA) sobre os discos, com meio de montagem *anti-fade* Prolong (Molecular Probes), as marcações foram examinadas em microscópio de epifluorescência Axio Imager (Zeiss) nas objetivas de 20x e 40x, acoplado a uma câmara fotográfica digital AxionCam MRm (Zeiss). As imagens foram sobrepostas e analisadas utilizando-se o programa Adobe Photoshop (Adobe Systems, CA, EUA).

3.4.2 Adesão e espraio celular

Para avaliação de adesão e espraio celular foram utilizados os mesmos discos preparados para o ensaio de morfologia descrito acima. O número de células foi contado em 10 campos diferentes para 2 h e 5 campos para 24 h em microscópio de epifluorescência Axio Imager (Zeiss) nas objetivas de 20x. O espraio celular foi determinado pela mensuração das áreas de 40 células cultivadas por 2 h, também analisadas no microscópio de epifluorescência na objetiva 20x, para cada

superfície avaliada. As imagens foram processadas e analisadas no programa Axion Vision 4.8.2 (Zeiss).

3.4.3 Proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada em triplicata, aos 7 e 10 dias pelo método colorimétrico MTT (*Thiazolyl blue tetrazolium bromide*). Esse ensaio é dependente da redução do MTT (Sigma), pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis, em formazan, o qual pode ser quantificado por espectrofotometria (Mosmann, 1983). As células foram incubadas em meio de cultura contendo MTT (5 mg/mL) por 4 h (Sanyo Electric Co.). O meio foi removido, foi acrescentado 1 mL de isopropanol ácido (100 mL de isopropanol – Merck, em 134 mL de ácido clorídrico a 0,04 N – Merck) e a placa de cultura mantida em um agitador de placas (Lab-Line Instruments, IL, EUA) por 10 min. Alíquotas de 150 µL da solução de cada poço foram transferidas para placas de 96 poços (Corning Incorporated) e a densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 570 nm em espectrofotômetro (µQuant, Biotek, VT, EUA) e os dados expressos como absorbância.

3.4.4 Imunofluorescência indireta para localização da ALP

Para a imunofluorescência indireta para localização da ALP, ao final de 10 dias, as células presentes sobre um disco de cada grupo foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% (Labsynth) em tampão fosfato (PB) 0,1M, pH 7,2, por 10 min à temperatura ambiente. As células foram rotineiramente processadas para imunofluorescência indireta, como descrito detalhadamente por De Oliveira *et al.* (2003) e De Oliveira e Nanci (2004). A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 (Acros Organics) a 0,5% em PB, durante 10 min, seguida de bloqueio

com leite desnatado a 5% em PB, durante 30 min. Foi incubado anticorpo primário para detecção de ALP (1:100, B4-78, DSHB, IA, EUA) por 1 hora, seguido de anticorpo secundário conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 594 (1:200, Molecular Probes) por 50 min. Para a visualização dos núcleos celulares foi utilizado o marcador DAPI (Molecular Probes). Após montagem dos discos, com meio de montagem *anti-fade* Prolong (Molecular Probes), as marcações foram examinadas por epifluorescência em microscópio de epifluorescência Axio Imager (Zeiss) na objetiva 40x, acoplado a uma câmara fotográfica digital AxionCam MRm (Zeiss). As imagens adquiridas foram sobrepostas e analisadas utilizando-se o programa Adobe Photoshop (Adobe Systems).

3.4.5 Medida da atividade de ALP

A atividade de ALP, realizada em quintuplicata, foi medida aos 10 e 14 dias, através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial (Labtest, MG, Brasil). Foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes. Em todos os tubos foram adicionados 50 µL de substrato e 500 µL de tampão. No tubo padrão foram acrescentados 50 µL da solução padrão. Os poços foram preenchidos com 1 mL de solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma). Ao final de 30 min, a solução contida em cada poço foi homogeneizada e 50 µL dessa solução foram transferidos para os tubos de ensaio previamente aquecidos em banho maria a 37 °C por 2 min e os tubos foram mantidos no banho por mais 10 min. Após esse período foram adicionados em cada tubo (branco, padrão e testes) 2 mL do reagente de cor. Alíquotas de 150 µL da solução de cada tubo foram transferidas para placas de 96 poços (Corning Incorporated) e a densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 590 nm em

espectrofotômetro (μ Quant). A atividade de ALP foi calculada a partir da medida do tubo padrão, normalizada pela quantidade de proteína total (obtida de acordo com o método descrito por Lowry *et al.*, 1951) e expressa em μ mol de timolftaleína/h/mg de proteína.

3.4.6 Detecção e quantificação da formação de nódulos de matriz extracelular mineralizada

Ao final de 14 dias, o meio das culturas de células derivadas da calvária de ratos recém-nascidos cultivadas em cinco discos de cada grupo foi removido, os poços com os discos lavados três vezes com solução tampão de Dulbecco - PBS (Gibco) aquecido a 37 °C e preenchidos com paraformaldeído a 4% (Labsynth) por 24 h. Em seguida, os poços contendo os discos foram desidratados em série crescente de álcoois e processados para coloração com vermelho de Alizarina (Sigma), que cora em vermelho áreas de mineralização ricas em cálcio. Os discos foram removidos dos poços e fotografados por câmera fotográfica digital (Nikon, TO, Japão). As imagens adquiridas foram processadas utilizando o programa Adobe Photoshop (Adobe Systems).

A quantificação da mineralização foi realizada de acordo com o método descrito por Gregory *et al.* (2004). A cada poço foram adicionados 280 μ L de ácido acético (Acros Organics) a 10% e mantidos à temperatura ambiente por 30 min sob agitação. Após esse período, a solução de cada poço foi homogeneizada e transferida para tubos de 1,5 mL. Os tubos foram incubados a 85 °C por 10 min e transferidos para recipiente contendo gelo, onde permaneceram por mais 5 min. Os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 20 min (Fischer Scientific) e 100 μ L do sobrenadante de cada tubo transferidos para placa de 96 poços (Corning

Incorporated). Foram adicionados 40 µL de hidróxido de amônia (Reagen, RJ, Brasil) em cada poço para neutralizar o ácido. Em seguida a densidade óptica foi lida em espectrofotômetro (µQuant), utilizando-se o comprimento de onda de 405 nm e os dados foram expressos como absorbância.

3.4.7 *Análise da expressão de genes marcadores do fenótipo osteoblástico*

Aos 10 dias foi avaliada a expressão por PCR em tempo real dos genes relacionados à osteogênese: *runt-related transcription factor 2* (*RUNX2*), *ALP* e *osteocalcina* (*OC*), em células cultivadas sobre 12 discos de Ti de cada grupo.

3.4.7.1 *Extração e quantificação de RNA total para PCR em tempo real*

O meio de cultura foi removido de todos os 12 poços da placa de cultura contendo os discos de Ti e, em seguida, adicionado 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA) no primeiro poço. Após homogeneização, para promover lise das células, esta mistura foi transferida para o próximo poço, e o mesmo procedimento realizado até o último poço de cada grupo avaliado. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante 15 min e armazenadas no freezer - 20 °C por, no mínimo, 24 h. Decorrido este período, para cada 1 mL da suspensão em trizol foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck). Os tubos foram manualmente agitados por 30 s e mantidos no gelo durante 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4 °C e 10500 rpm (Fischer Scientific), por 15 min, e a fase aquosa (superior) coletada em novos tubos de 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 250 µL de etanol 96% (Merck) às amostras e as mesmas centrifugadas em colunas de sílica gel presentes no kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, WI, EUA). A solução amostra/etanol foi agitada delicadamente e transferida para

uma nova coluna de sílica gel. Foram adicionados tampões específicos, intercalados por rápidas centrifugações de 15 s a 10500 rpm cada (Fischer Scientific). Após várias lavagens com os diferentes tampões, as amostras de RNA foram eluídas da coluna com 25 µL de água deionizada e tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, Acros Organics), livre de RNase, e armazenadas a - 80 °C, até a confecção do DNA complementar (cDNA). Para o preparo da água adicionou-se 1 mL de DEPC (Acros Organics) em 999 mL de água deionizada, tendo sido esta mistura mantida em temperatura ambiente por 24 h e posteriormente autoclavada por 30 min a 121 °C (Tuttnauer).

Para a quantificação das amostras de RNA total, uma alíquota de 2 µL foi diluída em 198 µL de água DEPC (Acros Organics), e analisada por espectrofotometria utilizando o aparelho Genequant 1300 (GE Healthcare, CT, EUA). A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 260 nm (ácido nucléico), 280 nm (proteína) e 230 nm (fenol), para detectar a concentração de RNA/µL nas amostras e contaminação por fenol ou proteínas.

3.4.7.2 Confecção da fita de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total por reação de transcrição reversa utilizando-se o kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, em um tubo de 200 µL foram adicionados 1 µg de RNA total diluído em um volume final de 10 µL de água previamente tratada com DEPC, 2 µL de *reverse transcriptase buffer*, 0,8 µL de deoxinucleotídeo (dNTP), 2 µL de *random primer*, 1 µL de MultiScribe™ *reverse transcriptase*, 1 µL de *RNase inhibitor* e 3,2 µL de água DEPC (Acros Organics), para um volume final de 10 µL/reação. Em seguida, as amostras

foram incubadas em termociclador Master Cycler Gradiente (Eppendorf AG) sob as seguintes condições: 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 de transcrição reversa as amostras de cDNA foram estocadas em freezer - 20 °C.

3.4.7.3 PCR em tempo real

Para realização da PCR em tempo real foi utilizado o sistema *SYBR Green* (Applied Biosystems), no aparelho CFX 96 (Bio-Rad, CA, EUA). Foi preparado um mix onde foram utilizados 7 µL do reagente *SYBR Green Master Mix* que contém o fluoróforo *SYBR Green*, a enzima polimerase *AmpliTaq Gold*, dNTPs e o fluoróforo *ROX*, utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência, além dos demais componentes de tampão e 0,5 µL da solução contendo cada *primer* (*forward* e *reverse*) com as concentrações adequadas, somando 8 µL. Foi preparado 2,5 µL da solução de cDNA com 2,5 µL de água deionizada autoclavada, totalizando 5 µL. Em cada poço da placa de 96 poços (Bio-Rad) foi adicionado 8 µL do mix e 5 µL da solução de cDNA, em triplicata, para cada *primer* selecionado. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências dos *primers* utilizados. A reação de amplificação compreendeu 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, quarenta ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C, além de um ciclo final de 20 min, com temperatura crescente de 60 °C a 95 °C, empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (*Ct*, do inglês *cycle threshold*). Como normalizador foi utilizada a expressão do gene constitutivo para β -actina (*ACTB*). Avaliou-se a expressão gênica dos seguintes marcadores do fenótipo osteoblástico:

RUNX2, *ALP* e *OC* (Tabela 2). Os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) e apresentaram eficiência entre 95-105%.

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 representados como diferença (em vezes) na expressão gênica, a qual foi normalizada pelo gene constitutivo e relativos às culturas realizadas sobre os discos do grupo controle.

Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes marcadores do fenótipo osteoblástico.

Gene	Primers forward e reverse	bp
<i>ACTB</i>	AAATGCTTCTAGGCGGACTG GGTTTGTCAAAGAAAGGGTG	495
<i>RUNX2</i>	CACAAACAACCACAGAACCAC TTGCTGTCCTCCTGGAGAAA	137
<i>ALP</i>	ACGTGGCTAAGAATGTCATC CTGGTAGGCGATGTCCTTA	475
<i>OC</i>	CAAAGGTGCAGCCTTTGTGTC TCACAGTCCGGATTGAGCTCA	150

ACTB: β -actina; *RUNX2*: runt related transcription factor 2; *ALP*: fosfatase alcalina; *OC*: osteocalcina; bp: número de pares de base do produto.

3.5 Análise estatística

A adesão e espraio celular em 2 h, atividade de ALP e mineralização foram analisados por ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey-b, quando apropriado. Adesão celular (24 h), proliferação celular, e expressão dos genes marcadores do fenótipo osteoblástico foram comparados pelo teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*. Para todos os testes diferenças em $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das superfícies dos discos de Ti

4.1.1 Análise da topografia e rugosidade

Os aspectos macroscópicos dos discos de Ti Controle e com os tratamentos de superfície (Figura 5).

Figura 5. Aspectos macroscópicos dos discos de Ti Controle e tratados.

A topografia das superfícies dos discos de Ti foi analisada a partir de fotomicrografias obtidas por MEV e de imagens tridimensionais de áreas de $10 \mu\text{m}^2$ obtidas por MFA (Figura 6). Em todas as imagens obtidas por MEV e na MFA, foram observadas diferenças na topografia das superfícies de todos os grupos estudados. A superfície do grupo Controle apresentou ranhuras aleatoriamente distribuídas, provenientes do preparo das amostras com lixas, como evidenciada em diferentes aumentos por MEV (Figura 6A, E e I). A imagem tridimensional obtida por MFA (Figura 6M) revela uma superfície com picos e vales pontiagudos de diferentes amplitudes, provavelmente representando as ranhuras observadas na MEV. A superfície do grupo C.Oco 3h, observada por MEV, apresentou topografia heterogênea semelhante a um

mosaico (Figura 6B, F e J), composta de áreas lisas e irregulares como evidenciada pela imagem obtida por MFA (Figura 6N). A superfície do grupo C.Oco 1h aparentou ser mais homogênea em aumentos menores (Figura 6C e G), mas em aumentos maiores no MEV e na MFA evidenciou-se a presença de picos pontiagudos de diferentes amplitudes e distribuídos de maneira aleatória (Figura 6K e O). O grupo Planar foi o que apresentou superfície mais homogênea, com predominância de picos e vales pontiagudos distribuídos de maneira mais uniforme (Figura 6D, H, L e P).

Figura 6. Fotomicrografias das superfícies de Ti controle e tratadas, obtidas por MEV (A-L) e MFA (M-P). As colunas representam os grupos Controle (A, E, I, M), C.Oco 3h (B, F, J, N), C. Oco 1h (C, G, K, O) e Planar (D, H, L, P). As três primeiras linhas representam os diferentes aumentos da MEV: 1.000x (A, B, C, D), 5.000x (E, F, G, H), 20.000x (I, J, K, L). Barra: A-D = 50 μm ; E-H = 10 μm ; I-L = 2,5 μm .

Dois parâmetros bidimensionais de rugosidade foram obtidos pelo programa NanoScope Analysis, a partir das imagens da área de 10 m^2 , o Ra e o Rq (Tabela 3).

Tabela 3. Valores das medidas de rugosidade (Ra e Rq) das superfícies de Ti controle e tratadas

Superfícies de Ti	Medidas de Rugosidade (nm)	
	Ra	Rq
Controle	15,5	19,1
C. Oco 3h	74,7	95,9
C. Oco 1h	23,1	32,2
Planar	34,3	42,9

4.1.2 Análise dos elementos químicos

A análise dos elementos químicos presentes nas diferentes superfícies dos discos de Ti foi obtida a partir da análise por EDS acoplada ao MEV. Os dados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Porcentagem relativa dos elementos químicos presentes nas superfícies de Ti controle e tratadas.

Superfícies de Ti	Elementos químicos (%)						
	Ti	O	Si	C	N	Al	Ca
Controle	27,37	26,52	0,84	38,88	-	1,02	2,26
C. Oco 3h	84,66	6,70	1,62	4,14	-	1,90	0,04
C. Oco 1h	46,76	11,49	-	2,77	37,94	0,83	0,10
Planar	50,27	16,84	-	2,52	29,16	0,84	0,07

- Indica elemento químico não detectado.

4.2 Avaliação das respostas celulares

4.2.1 Morfologia celular por fluorescência direta

Ao final de 2 h, as células osteoblásticas estavam aderidas sobre todas as superfícies e exibiam morfologia predominantemente arredondada (Figura 7A-D). Contudo, as células cultivadas sobre a superfície dos grupos Controle (Figura 7A), C. Oco 3h (Figura 7B) e C. Oco 1h (Figura 7C) apresentavam sinais de espraiamento quando comparadas às células osteoblásticas cultivadas sobre a superfície do grupo Planar (Figura 7 D).

Após 24 h, as células osteoblásticas encontravam-se com formato alongado e emitindo projeções citoplasmáticas (Figura 7E-H), distribuídas uniformemente por toda a superfície dos grupos Controle (Figura 7E), C. Oco 3h (Figura 7F) e C.Oco 1h (Figura 7G), enquanto no grupo Planar as células osteoblásticas apresentam aspecto alongado, mas aparentemente agrupadas (Figura 7H). Nota-se maior densidade celular sobre os superfícies dos grupos Controle e C. Oco 3h em relação aos grupos C. Oco 1h e Planar (Comparar Figura 7E e F com G e H).

Figura 7. Morfologia das células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano, cultivadas por 2 h (A-D) e 24 h (E-H) nas superfícies de Ti Controle (A e E), C.Oco 3h (C e F), C. Oco 1h (E e G) e Planar (D e H). Marcação por fluorescência direta do citoesqueleto de actina (faloidina) e núcleo (DAPI) dos osteoblastos. Barra A-D = 100 μ m; E-H = 50 μ m. Aumento 40x.

4.2.2 Adesão e espraio celular

A adesão celular foi determinada ao final de 2 h e 24 h de cultivo. Nos dois períodos avaliados, havia maior quantidade de células osteoblásticas aderidas à superfície do grupo C.Oco 3h em relação ao Controle (ANOVA, 2 h: $p=0,001$; Kruskal-Wallis, 24 h: $p=0,001$), e ambos maiores que os grupos C.Oco 1h e Planar, dentre os quais não houve diferença estatisticamente significativa. As células osteoblásticas cultivadas por 2 h sobre os discos do grupo C. Oco 1h apresentaram-se mais espraídas que as dos grupos C. Oco 3h e Planar, mas semelhantes ao Controle (ANOVA, $p=0,001$). Entre os grupos C. Oco 3h e Planar não foi encontrado diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados na Figura 8.

Figura 8. Número de células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano aderidas às diferentes superfícies de Ti após 2 h ($n=10$) e 24 h ($n=5$) de cultivo. Áreas das células osteoblásticas cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti após 2 h de cultivo ($n=40$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

4.2.3 Proliferação celular

Independentemente do tratamento de superfície, a proliferação celular foi maior aos 10 dias quando comparado aos 7 dias (Kruskal-Wallis, $p=0,001$). Mas o número de células osteoblásticas não foi afetado pelos tratamentos (Kruskal-Wallis, $p=0,779$). Os dados estão representados na Figura 9.

Figura 9. Proliferação de células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti, aos 7 e 10 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

4.2.4 Imunofluorescência indireta para localização da ALP

Após 10 dias do cultivo das células osteoblásticas sobre as diferentes superfícies de Ti, foi realizada a imunofluorescência indireta para marcação da ALP. As imagens da Figura 10 mostram a presença da ALP nas células cultivadas sobre todos os grupos mas não foi possível observar diferenças entre os mesmos.

Figura 10. Imunofluorescência indireta para localização da ALP produzida pelas células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano cultivadas por 10 dias nas diferentes superfícies de Ti. Aumento 40x. Barra: 50 μ m.

4.2.5 Medida da atividade de ALP

A atividade da ALP apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de cultivo (ANOVA, $p = 0,001$) e entre os grupos avaliados (ANOVA, $p=0,004$). Ao final de 10 dias, a atividade da ALP das células osteoblásticas cultivadas sobre a superfície do grupo Controle foi maior que a dos grupos tratados, e entre eles não foi encontrada diferença estatisticamente significativa. Aos 14 dias, as células cultivadas sobre as superfícies dos grupos C. Oco 3h e Planar apresentaram atividade da ALP maior que o grupo C. Oco 1h, e esse maior que o grupo controle. Os dados estão representados na Figura 11.

Figura 11. Atividade de ALP (expressa como nmol de timolftaleína/h/mg de proteína total) das células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano, cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti, aos 10 e 14 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

4.2.6 Detecção e quantificação da formação de nódulos de matriz extracelular mineralizada

Ao final de 14 dias, nódulos de matriz mineralizada foram evidenciados pelo corante vermelho de Alizarina (Figura 12).

Figura 12. Nódulos de matriz mineralizada produzidos por células osteoblásticas derivadas de calvária de ratos recém-nascidos, cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti, aos 14 dias.

Após a obtenção das imagens foi realizada a extração do vermelho de Alizarina e sua quantificação. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, $p=0,259$). Os dados estão representados na Figura 13.

Figura 13. Matriz mineralizada produzida por células osteoblásticas derivadas de calvária de ratos recém-nascidos e cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti, aos 14 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

4.2.7 Análise da expressão dos genes marcadores do fenótipo osteoblástico

A expressão relativa do gene *RUNX2* foi maior nos grupos C. Oco 3h e Planar, seguido dos grupos Controle e C. Oco 1h (Kruskal-Wallis, $p=0,001$) dentre os quais não foi encontrado diferença estatisticamente significante. A expressão relativa do gene *ALP* foi maior nas células cultivadas sobre as superfícies dos grupos tratados em relação ao grupo Controle, da seguinte forma: Planar maior que o C. Oco 1h, que por sua vez foi maior que o C. Oco 3h e este maior que o Controle (Kruskal-Wallis, $p=0,001$). Os tratamentos também afetaram a expressão do gene *OC* (Kruskal-Wallis, $p=0,001$); os grupos tratados apresentaram expressão menor que o Controle. Dentre os tratamentos, o grupo C. Oco 3h teve maior expressão que o C. Oco 1h, e este igual ao grupo Planar. Os dados estão representados na Figura 14.

Figura 14. Expressão dos genes marcadores do fenótipo osteoblástico (*RUNX2*, *ALP* e *OC*) das células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti, aos 10 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo, *ACTB*, e calibrados em relação ao controle. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado como o tratamento com diferentes técnicas de deposição iônica por plasma modificam a topografia de superfícies de Ti e, por consequência, afetam o fenótipo e a expressão gênica de células osteoblásticas cultivadas sobre as mesmas. Os tratamentos avaliados foram a nitretação por cátodo oco por 3 e 1 h e a nitretação planar; como controle foram utilizadas superfícies de Ti lixadas. Independentemente do tratamento, todas as superfícies de Ti permitiram adesão, espraçamento e proliferação celular, bem como as expressões fenotípica e genotípica características da diferenciação osteoblástica. A adesão foi maior no grupo C. Oco 3h e não foram observadas diferenças marcantes na morfologia e proliferação entre as superfícies de Ti tratadas e controle. No entanto, para as superfícies de Ti tratadas alguns parâmetros indicativos da diferenciação osteoblástica estavam aumentados, embora diferenças estatisticamente significantes não tenham sido detectadas para alguns deles.

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que diferentes tratamentos de superfícies do Ti podem gerar modificações na camada superficial destes, caracterizado por alterações físicas e químicas, responsáveis pelas diferenças dos resultados encontrados em estudos de osseointegração (Albrektsson, Wennerberg, 2004).

As análises das superfícies por MEV e MFA mostraram que os tratamentos resultaram em superfícies com topografias diferentes. A superfície do grupo C. Oco 3h apresentou topografia extremamente heterogênea, assemelhando-se a um mosaico composto por áreas distintas, sendo uma com rugosidade acentuada, apresentando picos e vales arredondados, contígua a uma outra área plana. Esse

aspecto seria causado pela alta ionização produzida pela nitretação em cátodo oco, uma vez que as partículas livres no plasma são obrigadas a refletirem sucessivamente entre duas superfícies catódicas (Alves Jr. *et al.*, 2005). Por outro lado, as superfícies dos grupos C. Oco 1h e Planar apresentaram-se mais uniformes, mas compostas de picos pontiagudos de diferentes amplitudes, distribuídos de maneira aleatória no grupo C. Oco 1h e mais uniforme no grupo Planar. Tais características são ligeiramente diferentes daquelas descritas por Sá (2009), o que pode ser devido à pequenas diferenças nos protocolos de nitretação das superfícies. As superfícies do grupo Controle apresentaram ranhuras típicas de superfícies lixadas, distribuídas aleatoriamente e indicando não terem passado por um processo de polimento. Essas ranhuras desapareceram após a nitretação, independente da técnica e tempo empregados.

A análise por MFA permitiu avaliar dois parâmetros de rugosidade das superfícies de Ti, Ra e Rq. De maneira geral, as superfícies tratadas apresentaram valores de Ra e Rq maiores que o grupo controle, indicando que essas superfícies eram mais rugosas. Esses achados corroboram com resultados de estudos anteriores que relataram aumento na rugosidade, expresso em valores de Ra, das superfícies de Ti tratadas por nitretação utilizando protocolos semelhantes aos descritos nesse estudo (Sá, 2009; Da Silva *et al.*, 2011). É necessário cautela ao interpretar esses resultados porque foi observado que a topografia de alguns grupos é irregular; ainda, foi avaliada somente uma área de $10 \mu\text{m}^2$ de uma amostra de cada grupo, o que faz com que nossas observações sejam qualitativas e não permitem a realização de análise estatística. Além disso, os parâmetros avaliados, Ra e Rq, são bidimensionais e a avaliação da topografia das superfícies deveria idealmente ser realizada a partir de análises tridimensionais (Wennerberg,

Albrektsson, 2010). No entanto, é interessante observar que todas as modificações observadas na rugosidade provocadas pelo tratamento com plasma foram na escala nanométrica, assim como observado por Pareta *et al.* (2009). sugerindo que esses tratamentos promovem modificações na nanotextura da superfície, o que estimularia vários processos biológicos e moleculares, representando uma nova tendência para o desenvolvimento de materiais implantáveis (Variola *et al.*, 2011).

A análise dos elementos químicos presentes na superfície de Ti dos diferentes grupos evidenciou que os tratamentos por plasma alteraram a composição química, representada principalmente pela redução nas porcentagens de C e O e pelo aumento nas porcentagens de Ti e N, sendo esse último elemento detectado somente nos grupos C. Oco 1h e Planar. Apesar de todos os grupos terem sido submetidos aos diferentes tratamentos nas mesmas condições de composição atmosférica, a não detecção do N na superfície do grupo C. Oco 3h não deve ser interpretado como ausência do elemento, uma vez que a caracterização topográfica desse grupo mostrou que a superfície foi modificada pela nitretação de maneira heterogênea, e o mesmo pode ter ocorrido com a composição química. Outros tratamentos de Ti por plasma resultam, de maneira similar, em aumento na porcentagem de Ti e redução na de C (Coelho *et al.*, 2012). Átomos de C são considerados contaminantes da superfície de Ti (Le Guehennec *et al.*, 2008), e os nossos resultados confirmam que tratamentos por plasma, além de modificações físico-químicas, contribuem para a limpeza dessas superfícies (Alves Jr. *et al.*, 2005; Pareta *et al.*, 2009; Sá, 2009; Da Silva *et al.*, 2011; Koban *et al.*, 2012). A literatura mostra que a presença de hidrocarbonetos na superfície do Ti torna-o mais hidrofóbico; assim, a limpeza tornaria a superfície mais hidrofílica e essa característica seria mantida nas condições ambientes (Rupp *et al.*, 2004). A

presença de Si é devido ao preparo das amostras, realizado com lixas de carbetto de Si e polimento com sílica.

Uma série de estudos investiga a relação entre a rugosidade e química de superfície do Ti com os eventos iniciais da osseointegração, como adesão e espraiamento celular, que podem influenciar a morfologia, a capacidade de proliferação e de diferenciação celular (Schwartz, Boyan, 1994; Martin *et al.*, 1995; Anselme, 2000; Anselme *et al.*, 2000; Bachle, Kohal, 2004; Le Guehennec *et al.*, 2008; Koban *et al.*, 2012). Todas as superfícies de Ti avaliadas permitiram a adesão e espraiamento celular. Os grupos com os maiores valores de Ra e com distribuição irregular de picos e vales permitiram uma maior adesão celular e apresentaram células menos espraiadas. Assim, é possível sugerir que o perfil heterogêneo das superfícies dos grupos Controle e C. Oco 3h, pode ter predisposto o aumento da adesão das células osteoblásticas nas áreas uniformes, enquanto as regiões irregulares dificultaram seu espraiamento. Corroborando nossos achados, a avaliação da adesão de células osteoblásticas em cinco superfícies de Ti com diferentes valores de Ra mostrou uma relação direta entre a adesão e o padrão de irregularidade das superfícies (Anselme *et al.*, 2000). Quanto menos rugosa ou mais regularmente dispostas as ranhuras na superfície de Ti, maior a adsorção de proteínas com consequente aumento da adesão e espraiamento das células (Anselme *et al.*, 2000).

As alterações topográficas das superfícies avaliadas que resultaram em diferenças na adesão celular, não alteraram de forma significativa a morfologia celular, de acordo com estudos envolvendo superfícies de Ti e ligas tratadas com plasma pelas mais variadas técnicas e condições (Clem *et al.*, 2006), sugerindo que

a morfologia das células osteoblásticas independe de características químicas e topográficas das superfícies sobre as quais essas são cultivadas (Wirth *et al.*, 2008).

A proliferação celular também não foi afetada pelo tratamento com plasma, concordando com dados da literatura em que as mesmas superfícies de Ti foram avaliadas utilizando células da linhagem MC3T3-E1 (Da Silva *et al.* 2011) e células mesenquimais indiferenciadas derivadas de sangue de cordão umbilical, quando comparadas à superfície lisa (Sá, 2009). No entanto, modificações na composição da atmosfera gasosa que compõe o plasma, da temperatura, da pressão e do tempo de tratamento parecem promover um aumento da proliferação de células cultivadas sobre as superfícies de Ti tratadas (Czarnowska *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2008), provavelmente por produzirem superfícies com características físico-químicas diferentes e que possam influenciar o comportamento biológico.

A atividade da ALP foi maior no grupo Controle em períodos iniciais e se manteve estável, enquanto os grupos tratados apresentaram um aumento da atividade da ALP ao longo do tempo, sendo que aos 14 dias foi maior em relação ao grupo Controle. Considerando a atividade da ALP como um marcador do processo de diferenciação celular e o padrão de atividade de ALP de células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano (Beloti *et al.*, 2006), é possível sugerir que as células cultivadas sobre as superfícies de Ti tratadas apresentaram atraso no processo de diferenciação. No entanto, com a progressão das culturas, houve um aumento da diferenciação das células cultivadas nessas superfícies. Esse resultado pode ser, em parte, relacionado com as características topográficas das superfícies tratadas, de acordo com a literatura que demonstra que superfícies mais rugosas tendem a aumentar esse fenômeno (Lincks *et al.*, 1998; Bachle, Kohal, 2004; Huang *et al.*, 2004; Kim, 2006; Olivares-Navarrete *et al.*, 2011). Entretanto, resultados

obtidos para a expressão do gene da ALP e imunolocalização da ALP são contraditórios e não apresentam correlação com a atividade de ALP obtida. Tal discrepância pode ser devida aos diferentes mecanismos de regulação pós-transcricional encontrados nas células eucariotas (Klein *et al.*, 2011; Lian *et al.*, 2012) e que não puderam ser detectados nesse estudo.

Por outro lado, a expressão dos outros genes marcadores do fenótipo osteoblástico estão de acordo com os resultados obtidos para a atividade da ALP. O aumento na capacidade de diferenciação osteoblástica fica evidente na expressão do gene *RUNX2*, essencial para essa diferenciação pela capacidade em regular vários outros genes envolvidos nesse processo (Komori *et al.*, 1997; Karsenty, 2008; Lian *et al.*, 2012), aumentado nos grupos C.Oco 3h e Planar. O atraso na diferenciação celular, observado nas superfícies tratadas, pode ser caracterizado pela expressão do gene *OC*, marcador final da osteogênese e expresso por osteoblastos maduros como regulador negativo da mineralização (Karsenty, 2008; Ducky *et al.*, 1996). Sua expressão está aumentada no grupo controle aos 10 dias, indicando que a cultura encontra-se mais adiantada nessa superfície em relação aos grupos tratados.

Nesse estudo não foi possível detectar diferenças estatisticamente significantes na formação de matriz extracelular mineralizada, embora tenha sido observado um aumento da mineralização nos grupos C.Oco 3h e Planar. Esse evento final da diferenciação osteoblástica é resultado de todas as interações célula-biomaterial que irão ativar uma série de mecanismos resultando em estímulo das funções celulares (Nebe *et al.*, 2004; Elias, Meirelles, 2010). No entanto, o estabelecimento de uma relação direta entre os outros resultados obtidos nesse estudo e a mineralização deve ser cuidadosa, uma vez que os ensaios de

mineralização foram realizados com células de origem distinta daquelas utilizadas para todos os outros experimentos.

Na literatura pesquisada não foram encontrados trabalhos que avaliem a relação entre as modificações da superfície do Ti provocadas pelo tratamento por nitretação e as respostas celulares tardias de células cultivadas sobre essas superfícies. Os resultados do presente estudo mostraram que as modificações de superfícies de Ti por deposição iônica por plasma realizada por diferentes técnicas de nitretação afetam muitos dos eventos envolvidos na interação entre células e as superfícies. Embora não tenham sido verificadas diferenças acentuadas, todos os parâmetros biológicos avaliados tenderam a ser maiores nas células cultivadas sobre as superfícies dos grupos C. Oco 3h e Planar. Considerando que os dados obtidos *in vitro* não necessariamente refletem o aumento da quantidade de tecido ósseo formado ou a aceleração do processo de osseointegração, estudos *in vivo* utilizando essas superfícies de Ti tratadas por deposição iônica por plasma, representam o próximo passo das pesquisas sobre essas superfícies.

6. CONCLUSÕES

1. A deposição iônica por plasma, nas condições de atmosfera, pressão e temperatura selecionadas modifica a topografia, aumenta a rugosidade e altera a composição química das superfícies dos discos de Ti.

2. Essas alterações das superfícies dos discos afetam a manifestação do fenótipo osteoblástico dependendo da técnica de nitretação utilizada, caracterizada por um atraso no processo de diferenciação e aumento da capacidade de diferenciação celular notadamente para o Cátodo Oco 3h e Planar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson H, Lindström J. Osseointegrated titanium implants: Requirements for insuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Ortho Scand*.1981;52:155-170.

Albrektsson T, Johansson C. Quantified bone tissue reactions to various metallic materials with reference to the so-called osseointegration concept. In: Davies JE. *The Bone-Biomaterial Interface*. Buffalo: University of Toronto Press.1991:357-363.

Albrektsson T., Wennerberg A. Oral implant surfaces: part 1 – review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and *in vivo* responses to them. *Int J Prosthodont*. 2004;17:536-543.

Alves Jr C, Guerra Neto CLB, Morais GHS, Da Silva CF, Hajek V. Nitriding of titanium disks and industrial dental implants using hollow cathode discharge. *Surf and Coat Tech*. 2005;194(2-3):196-202.

Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000;21:667-681.

Anselme K, Linez P, Bigerelle M, Le Manger D, Le Manger A, Hardouin P, Hildebrand HF, Iost A, Leroy JM. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials* 2000;21:1567-1577.

Assis AF, Beloti MM, Grippa GE, De Oliveira PT, Morra M, Rosa AL. Development of the osteoblastic phenotype in human alveolar bone-derived cells grown on a collagen type I-coated titanium surface. *Clin Oral Implant Res*. 2009;20(3):240-246.

Attard NJ, Zarb GA. Long-term treatment outcomes in edentulous patients with implant overdentures: the Toronto study. *Int J Prosthodont*. 2004;17(4):425-433.

Aubin JE, Liu F, Malaval F, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*. 1995;17(2):77-83.

Bachle M, Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15:683-692.

¹ De acordo com o Estilo VANCOUVER

Beloti MM, De Oliveira PT, Gimenes R, Zaghete MA, Bertolini MJ, Rosa AL. In vitro biocompatibility of a novel membrane of the composite polyvinylidene-trifluoroethylene/bariumtitanate. *J Biomed Mater Res Part A*. 2006;79(2):282-288.

Bombonato-Prado KF, Wimmers MR, Rosa AL, De Oliveira PT, Jahno VD, Da Silva JB, Ligabue R, Einloft S. Human alveolar bone derived cell culture behaviour biodegradable poly(L-lactic Acid). *J Biomater Sci Polym Ed*. 2009;20(2):167-179.

Brånemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. *Tissue-Integrated Prostheses. Osseointegration in clinical dentistry*. Chicago, USA. Quintessence Publishing Co Inc. 1985.

Brunski JB, Puleo DA, Nanci A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15(1):15-46.

Bueno RB, Adachi P, Raucci LMC, Rosa AL, Nanci A, De Oliveira PT. Oxidative nanopatterning of titanium surfaces promoter production and extracellular accumulation of osteopontin. *Braz Dent J*. 2011;22(3):179-184.

Canabarro A, Diniz MG, Paciornik S, Carvalho L, Sampaio EM, Beloti MM, Rosa AL, Fischer RG. High concentration of residual aluminium oxide on titanium surface inhibits extracellular matrix mineralization. *J Biomed Mater*. 2008; 87(3):588-597.

Carvalho DR, Carvalho PS, Magro-Filho O, De Mello JD, Beloti MM, Rosa AL. Characterization and in vitro cytocompatibility of an acid-etched titanium surface. *Braz Dent J*. 2010;21(1):3-11.

Chang WJ, Ou KL, Lee SY, Chen JY, Abiko Y, Lin CT, Huang HM. Type I collagen grafting on titanium surfaces using low-temperature glow discharge. *Dent Mater J*. 2008;27(3):340-346.

Chien C-C, Liu K-T, Duh J-G, Chang K-W, Chung K-H. Effect of nitride film coatings on cell compatibility. *Dent Mater*. 2008; 24:986–993.

Chu PK, Chen JY, Wang LP, Huang N. Plasma surface modification of biomaterial. *Mat Sci Eng*. 2002;36:143-206.

Clem WC, Konovalov VV, Chowdhury S, Vohra YK, Catledge SA, Belis SL. Mesenchymal stem cell adhesion and spreading on microwave plasma-nitrided titanium alloy. *J Biomed Mater Res Part A*. 2006;76(2):279-287.

Coelho PG, Giro G, Teixeira HS, Marin C, Witek L, Thompson VP, Tovar N, Silva NR. Argon-based atmospheric pressure plasma enhances early bone response to rough titanium surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2012. 100(7):1901-1906.

Czarnowska E, Wierzchon T, Maranda-Niedbata A, Karczmarewicz E. Improvement of titanium alloy for biomedical applications by nitriding and carbonitriding process under glow discharge conditions. *J Mater Sci Mater Med*. 2000;11(2):73-81.

Da Silva JSP, Amico SC, Rodrigues AON, Barbosa CAG, Alves Jr C, Croci AT. Osteoblastlike cell adhesion on titanium surfaces modified by plasma nitriding. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011;26(2):237-244.

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

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.

De Oliveira PT; Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials*. 2004;25(3):403-413.

Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundeberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1996;382(1):448-452.

Elias CN, Meirelles L. Improving osseointegration of dental implants. *Exp Rev Med Dev*. 2010;7(2):241-256.

Faria AC, Beloti MM, Rosa AL. Nitric acid passivation does not affect in vitro biocompatibility of titanium. *Int J oral Maxillofac Implants*. 2003;18(6):820-825.

Friberg B, Nilson H, Olsson M, Palmquist C. Mk II: the self-tapping Branemark implant: 5-year results of a prospective 3 center study. *Clin Oral Implants Res*. 1997;8(4):279-285.

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(1):77-84.

Groessner-Schreiber B, Neubert A, Müller WD, Hoop M, Griepentrog M, Lange KP. Fibroblast growth on surface-modified dental implants: an *in vitro* study. J Biomed Mater Res Part A. 2003;64(4):591-599.

Hahn H, Palich W. Preliminary evaluation of porous metal surfaced titanium for orthopedic implants. J Biomed Mater Res. 1970;4(4):571-577.

Huang HH, Ho CT, Lee TH, Lee TL, Liao KK, Chen FL. Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. Biomol Eng. 2004;21(3-5):93-97.

Jemt T. Fixed implant-supported prostheses in edentulous maxilla. A Five-year follow-up report. Clin Oral Implants Res. 1994;5(3):142-147.

Jemt T, Bergendal B, Arvidson K, Bergendal T, Karlsson LD, Linden B, Runcrantz T, Wendelhag I. Implant-supported welded titanium frameworks in the edentulous maxilla: a 5-year prospective multicenter study. Int J Prosthodont. 2002;15(6):544-548.

Jemt T, Johansson J. Implant treatment in edentulous maxillae: a 15-year follow-up study on 76 consecutive patients provided with fixed prostheses. Clin Implant Dent Relat Res. 2006;8(2):61-69.

Karsenty G. Transcriptional control of skeletogenesis. Annu Rev Genom Hum Genet. 2008;9:183-196.

Kasemo B, Gold J. Implant Surfaces and Interface Process. Adv Dent Res. 1999;13:8-20.

Kim MJ, Kim CW, Lim YJ, Heo SJ. Microrough titanium surface affects biologic response in MG63 osteoblast-like cells. J Biomed Mater Res Part A. 2006;79(4):1023-1032.

Klein MO; Bijelic A; Ziebart T; Koch F.; Kämmerer PW; Wieland M.; Konerding MA; Al-Nawas B. Submicron scale-structured hydrophilic titanium surfaces promote early osteogenic gene response for cell adhesion and cell differentiation. Clin Implant Dent Rel Res. 2011. In press. doi: 10.1111/j.1708-8208.2011.00339.

Koban DK, Koban I, Kindel E, Schröder K, Nebe B, Holtfreter B, Jablonowski L, Weltmann KD, Kocher T. Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals. J Clin Periodontol. 2012;39(4):400-407.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamagushi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M. Target disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblast. *Cell*. 1997;89:755-764.

Lacefield WR. Materials characteristics of uncoated/ceramic-coated implant materials. *Adv Dent Res*. 1999;13:21-26.

Lai HC, Zhuang LF, Liu X, Wieland M, Zhang ZY, Zhang ZY. The influence of surface energy on early adherent events of osteoblast on titanium substrates. *J Biomed Mater Res Part A*. 2009;93(1):289-296.

Lang NP, Jepsen S. Implant surface and design (Working Group 4). *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(4):228-231.

Le Guehennec L, Lopez-Heredia MA, Enkel B, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomater*. 2008;4(3):535-543.

Lekholm U, Zarb GA. Patient selection and preparation. In: Brånemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. *Tissue-Integrated Prostheses. Osseointegration in clinical dentistry*. Chicago, USA. Quintessence Publishing Co Inc. 1985.

Lian JB, Stein GS, Van Wijnen AJ, Stein JL, Hassan MQ, Gaur T, Zhang Y. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(4):212-227.

Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Lui Y, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*. 1998;19:2219-2232.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.

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

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

Meirelles L, Currie F, Jacobsson M, Albrektsson, Wenneberg A. The effect of chemical and nanotopographical modifications on the early stages of osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008;23(4):641-647.

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

Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.

Nebe B, Luthen F, Lange R, Becker P, Beck U, Rychly J. Topography-induced alterations in adhesion structures affect mineralization in human osteoblasts on titanium. *Mat Sci Eng C Bio*. 2004;24(5):619-624.

Olivares-Navarrete R, Raines AL, Hyzy SL, Park, JH, Hutton DL, Cochran DL, Boyan BD, Schwartz Z. Osteoblast maturation and new bone formation in response to titanium implant surface features and reduced with age. *J Bone Miner Res*. 2012;27(8):1773-1783.

Oliveira CJ. Avaliação da influência de sistemas de filtragem aplicados a topografia de superfícies em usinagens. [Dissertação]. Belo Horizonte; Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. 2004.

Oliveira VMB, et al. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso. Parte IV (Vancouver). 2 ed. Rev Ampliada. São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. 2009.

Pareta RA, Reising AB, Miller T, Storey D, Webster TJ. An understanding of enhanced osteoblast adhesion on various nanostructured polymeric and metallic materials prepared by ionic plasma deposition. *J Biomed Mat Res Part A*. 2010;92(3):1990-1201.

Park J, Kim DJ, Kim YK, Leea KW, Lee KH, Lee H, Ahn S. Improvement of the biocompatibility and mechanical properties of surgical tools with TiN coating by PACVD. *Thin Solid Films*. 2003;435:102-107.

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

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

Rosa AL, Crippa, GE, De Oliveira PT, Taba Jr M, Lefebvre LP, Beloti MM. Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. *Clin Oral Implant Res.* 2009; 20(5):472-481.

Rupp FL, Scheideler L, Rehbein D, Axmann D, Geis-Gerstorfer J. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials.* 2004;25:1429-1438.

Sá JC. Efeito da modificação de superfícies de titânio tratadas por plasma na proliferação de células-tronco visando aplicações odontológicas. [Tese] Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2009.

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

Schwartz Z, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem.* 1994;56:340-347.

Schwarz F, Wieland M, Schwartz Z, Zhao G, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Schedle A, Broggini N, Bornstein MM, Buser D, Ferguson SJ, Becker J, Boyan BD, Cochran DL. Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;88(2):544-557.

Sennerby L, Roos J. Surgical determinants of clinical success of osseointegrated oral implants: a review of the literature. *Int J Prosthodont.* 1998;11(5):408-420.

Smith DE, Zarb GA. Criteria for success of osseointegrated endosseous implants. *J Prosthet Dent.* 1989;62(5):567-572.

Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Röser K, Wennerberg A, Albrektsson T. Oxidized implants and their influence on the bone response. *J Mat Sci Mater Med.* 2001;12:1025-1031.

Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000;15(5):675-690.

Teixeira LN, Crippa GE, Lefebvre LP, De Oliveira PT, Rosa AL, Beloti MM. The influence of pore size on osteoblast phenotype expression in cultures grown titanium. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2012.02.020>

Van Steenberghe D, Lekholm U, Bolender C, Folmer T, Herrmann I, Henry P, Higuchi K, Laney Y, Linden U, Astrand P. Applicability of osseointegrated oral implants in the rehabilitation of partial edentulism: A prospective multicenter study on 558 fixtures. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1990;5:272-281.

Variola F, Brunski JB, Orsini G, De Oliveira PT, Wazen R, Nanci A. Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the-art and perspectives. *Nanoscale*. 2011;3(2):335-353.

Wennerberg A, Albrektsson T, Lindhe J. Surface topography on titanium implants. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 4 ed. Blackwell Publishing Co. Oxford. 2003:821-825.

Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009; 20(4):172-184.

Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implant*. 2010;25(1):63-74.

Wennerberg A, Albrektsson T. Current challenges in successful rehabilitation with oral implants. *J Oral Rehabil*. 2011;38(4):286-294.

Wirth C, Grosogoeat B, Lagneau C, Jaffrezic-Renault N, Ponsonnet L. Biomaterial surface properties modulate *in vitro* rat calvaria osteoblast response: Roughness and or chemistry? *Mater Sci Eng*. 2008;28:990-1001.

Xiao Y, Qian H, Young WG, Bartold PM. Tissue engineering for bone regeneration using differentiated alveolar bone cells in collagen scaffolds. *Tissue Eng*. 2003;9(6):1667-1677.

Zarb GA, Albrektsson T. Osseointegration: a requiem for the periodontal ligament?. *Int J Periodont Rest Dent*. 1991;11:88-91.

Zhao C, Cao P, Ji W, Han P, Zhang J, Zhang F, Jiang Y, Zhang X. Hierarchical titanium surface textures affect osteoblastic functions. *J Biomed Mater Res Part A*. 2011;99(4):666-675.