UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

DANIEL GALVÃO COSTA

**EFEITO DE SUPERFÍCIE DE TITÂNIO COM NANOTOPOGRAFIA REVESTIDA
COM COLÁGENO SOBRE A OSTEOGÊNESE IN VITRO**

PG.PERIO
FOP- USP

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

DANIEL GALVÃO COSTA

**EFEITO DE SUPERFÍCIE DE TITÂNIO COM NANOTOPOGRAFIA REVESTIDA
COM COLÁGENO SOBRE A OSTEOGÊNESE IN VITRO**

Ribeirão Preto

2016

DANIEL GALVÃO COSTA

**EFEITO DE SUPERFÍCIE DE TITÂNIO COM NANOTOPOGRAFIA REVESTIDA
COM COLÁGENO SOBRE A OSTEOGÊNESE IN VITRO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção de título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Área de Concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

Ribeirão Preto

2016

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

Costa, Daniel Galvão

Efeito da Superfície de titânio com nanotopografia revestida com colágeno sobre a osteogênese in vitro. Ribeirão Preto, 2016.

54 p. : il; 30cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Adalberto Luiz Rosa

1.Titânio. 2.Nanotopografia. 3.Colágeno. 4.Osteogênese. 5.Osteoblastos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniel Galvão Costa

Efeito da Superfície de titânio com nanotopografia revestida com colágeno sobre a osteogênese in vitro.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção de título de Mestre em Odontologia (Periodontia), área de concentração Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado nos Laboratórios de Cultura de Células e Biologia Molecular, do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 132960/2014-1.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais, Fernando Nestor e Izabel Christina, que além do incentivo e apoio, dedicaram muito amor e sacrifício esses anos que estivemos longe, para que esta conquista fosse possível.

Aos meus irmãos, presentes em todos os momentos, em um telefonema transformavam meus momentos de solidão em momentos alegres de companheirismo.

À minha segunda mãe, Deusdete Pereira, que de maneira muito carinhosa e participativa esteve sempre presente na minha formação.

À minha namorada, Alini, essencial para essa minha conquista, tornando esta caminhada mais suave com seu apoio, paciência e carinho. Te amo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter sido o guia do meu caminho, por me presentear com uma família maravilhosa, saúde e colocar constantemente em meu caminho pessoas que contribuem para vencer os desafios da vida.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo por ter me acolhido e proporcionado um ambiente favorável ao conhecimento e à pesquisa.

À família da minha namorada por terem sido compreensivos e atenciosos durante esses anos e por sempre me receberem em seu lar, um ambiente agradável e descontraído.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, muito obrigado pela orientação, confiança, paciência e por ter me proporcionado uma grande oportunidade de aprendizado profissional e pessoal. Referência no meio acadêmico por sua extrema dedicação à pesquisa e contribuição científica.

Ao Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, por quem tenho respeito e admiração. Um exemplo de professor e de pesquisador.

Ao Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, sempre disposto a ajudar, muito obrigado!!!.

Ao pesquisador Marco Morra pela parceria com a USP, por intermédio do Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, por ter contribuído com o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os professores que convivi durante o Mestrado: Dr. Alexandre Trivellato, Dr. Cassio Sverzut, Dr. Samuel Xavier, Dra. Karina Fittipaldi, Dr. Mário Taba, Dr. Pardini, pela transmissão de conhecimentos durante as disciplinas.

Ao Prof. Dr. Thiago de Santana Santos, um exemplo de profissional. Sinto-me orgulhoso por tê-lo conhecido ainda nos meus tempos de graduação na Universidade Federal de Sergipe e hoje poder chamá-lo de amigo. Profissional por quem tenho profunda admiração. Um exemplo a ser seguido.

Ao meu amigo Heitor Fontes da Silva por ter me ajudado durante o mestrado e ter proporcionado momentos de alegria durante esta caminhada.

Ao amigo Patrick Osborne, que conheci durante a pós-graduação, pelas cirurgias que realizamos, bem como, pelo companheirismo e momentos de distração.

Aos meus tios Luiz Alberto e Graça, por serem uma extensão da minha família e um refúgio nos momentos em que precisei de descanso. Muito Obrigado!!

À Emanuela Prado Ferraz e Rodrigo Abuná, por toda ajuda durante a realização deste trabalho, pessoas de fácil convivência e sempre solícitas e disponíveis.

À Larissa Castro-Raucci pela paciência de ter me ensinado os procedimentos laboratoriais no início do mestrado, sempre disposta a ajudar todos à sua volta.

Aos funcionários: Adriana Luisa Gonçalves de Almeida, Fabíola Singaretti de Oliveira, Milla Sprone Tavares e Roger Rodrigues Fernandes pelo apoio e auxílio prestado no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Células: Gileade Pereira Freitas, Helena Bacha Lopes e Alann Thaffarell pelos bons momentos vividos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro ao desenvolvimento da pesquisa e pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

COSTA DG. EFEITO DE SUPERFÍCIE DE TITÂNIO COM NANOTOPOGRAFIA REVESTIDA COM COLÁGENO SOBRE A OSTEOGÊNESE IN VITRO. Dissertação (Mestrado). Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016. 54 p.

Em Implantodontia, o titânio (Ti) é o material de escolha para a confecção dos implantes dentários por apresentar excelentes propriedades mecânicas e biocompatibilidade. Entretanto, novas estratégias de modificações da topografia e da composição bioquímica da superfície de Ti vêm sendo pesquisadas com o objetivo de incrementar a biocompatibilidade do Ti. A combinação de alterações topográficas em escala nanométrica e revestimento com o colágeno tipo I seria uma modificação com potencial para aumentar e/ou acelerar o processo de osseointegração. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de superfície de Ti com nanotopografia revestida com colágeno sobre a osteogênese in vitro. Para isso, osteoblastos derivados de calvária de ratos foram cultivados em meio osteogênico sobre 4 superfícies de Ti: usinada (Ti Usi), usinada revestida com colágeno (Ti Usi/Col), com nanotopografia (Ti Nano) e com nanotopografia revestida com colágeno (Ti Nano/Col). A osteogênese foi avaliada pelos seguintes parâmetros: viabilidade celular; expressão das proteínas sialoproteína óssea (BSP) e osteopontina (OPN); atividade de fosfatase alcalina (ALP); expressão dos genes ALP, colágeno tipo I (COL), osteocalcina (OC), OPN, osterix (OSX) e runt-related transcription factor 2 (RUNX-2); e a formação de matriz extracelular mineralizada. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls e o nível de significância adotado foi de 5%. Aos 7 dias, a viabilidade celular foi maior sobre a superfície Ti Nano/Col, comparada às outras superfícies, dentre as quais não foi detectada diferença estatisticamente significativa. Houve um

aumento da atividade da ALP dos 7 para os 10 dias; aos 7 dias, a atividade da ALP foi menor na superfície Ti Usi em comparação às superfícies Ti Nano e Ti Nano/Col; e aos 10 dias a atividade da ALP foi maior nas células crescidas sobre a superfície Ti Nano/Col comparado às demais superfícies. A imunolocalização, tanto para a OPN aos 3 dias quanto para BSP aos 7 e 10 dias, foi maior nos grupos Ti Nano e Ti Nano/Col com marcações fortes por todo o citoplasma além de depósitos extracelulares adjacentes às células. A expressão dos genes marcadores osteoblásticos avaliados foi maior sobre as superfícies Ti Nano e Ti Nano/Col, em comparação com as superfícies Ti Usi e Ti Usi/Col. A formação de matriz mineralizada foi maior nas superfícies Ti Usi/Col e Ti Nano/Col em relação às superfícies Ti Usi e Ti Nano, dentre as quais não foi detectada diferença estatisticamente significativa. Esses resultados sugerem que a combinação de nanotopografia com revestimento com colágeno de superfícies de Ti estimula os eventos intermediários da osteogênese e tem potencial para favorecer a osseointegração dos implantes de Ti.

Palavras-chave: Titânio; nanotopografia; colágeno; osteogênese; osteoblastos.

ABSTRACT

COSTA DG. EFFECT OF TITANIUM SURFACE WITH NANOTOPOGRAPHY COATED WITH COLLAGEN ON IN VITRO OSTEOGENESIS Thesis (Master's Degree). Ribeirão Preto: School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2016. 54 p.

In Implantology, titanium (Ti) is the material of choice for the manufacture of dental implants because of its excellent mechanical properties and biocompatibility. However, new strategies to modify the topography and biochemical composition of Ti surfaces have been tested in order to increase the biocompatibility of Ti. The combination of topographic changes at the nanoscale and coating with collagen type I has potential to increase and/or accelerate the osseointegration process. The aim of this study was to evaluate the effect of Ti surface with nanotopography coated with collagen on in vitro osteogenesis. For this, osteoblasts harvested from rat calvaria were cultured in osteogenic medium on 4 Ti surfaces: machined (Ti Usi), machined coated with collagen (Ti Usi/Col), nanotopography (Ti Nano) and nanotopography coated with collagen (Ti Nano/Col). The osteogenesis was evaluated using the following parameters: cell viability; expression of bone sialoprotein protein (BSP) and osteopontin (OPN); Alkaline phosphatase (ALP) activity; gene expression of ALP, type I collagen (COL), osteocalcin (OC), OPN, osterix (OSX) and runt-related transcription factor 2 (RUNX-2); and the formation of mineralized extracellular matrix. Data were compared by analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls post-test and the significance level was set at 5%. At 7 days, cell viability was higher on the Ti Nano/Col compared

to other surfaces, among which was not detected statistically significant differences. There was an increase in ALP activity from 7 to 10 days; at 7 days, the activity of ALP was lower in Ti Usi surface compared to Ti Nano and Ti Nano/Col surfaces; and at 10 days the activity of ALP was higher in cells grown on the Ti Nano/Col surface compared to other surfaces. The immunolocalization to both OPN at 3 days and BSP at 7 and 10 days was higher in Ti Nano and Ti Nano/Col surfaces with strong labeling throughout the cytoplasm as well as extracellular deposits. The expression of the osteoblast marker genes was higher on Ti Nano and Ti Nano/Col surfaces compared to Ti Usi and Ti Usi/Col surfaces. The formation of mineralized matrix was higher in Ti Usi/Col and Ti Nano/Col surfaces than in Ti Usi and Ti Nano between which there was no statistically significant difference. These results suggest that the combination of nanotopography with collagen in Ti surfaces stimulates the intermediate events of the in vitro osteogenesis and seems to have potential to promote osseointegration of Ti implants.

Keywords: Titanium; nanotopografia; collagen; osteogenesis; osteoblasts.

FIGURAS

Figura 1. Micrografia por MEV das superfícies de Ti. Barra de escala: A-D=100µm e E-H= 500nm.....34

Figura 2. Topografia por MFA de superfícies de Ti.....35

Figura 3. Viabilidade celular de células osteoblásticas derivadas de calvária de ratos recém-nascidos cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti aos 7 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=4). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.....36

Figura 4. Imunofluorescência indireta de células osteoblásticas derivadas de calvária de ratos recém-nascidos cultivadas sobre as superfícies Ti Usi (A; E; I), Ti Usi/Col (B; F; J), Ti Nano (C; G; K) e Ti Nano/Col (D; H; L) para localização de OPN (A-D) aos 3 dias e de BSP (E-L) aos 7 e 10 dias de cultura. O citoesqueleto de actina (A-D) é visualizado em verde (Faloidina + AlexaFluor 488) e os núcleos celulares (A-L), em azul (DAPI). Barra de escala para (A-D) = 50 µm; (E-H) = 100 µm e (I-L) = 200 µm.....37

Figura 5. Atividade de ALP (expressa como µmol de timolftaleína/h/mg de proteína total) de células osteoblásticas derivadas de calvária de ratos recém-nascidos, cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti, aos 7 e 10 dias. Os dados são

apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.....38

Figura 6. Expressão dos genes das células osteoblásticas provenientes da calvária de ratos recém-nascidos cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti, aos 7 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo, GAPDH, e calibrados em relação ao controle. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.....39

Figura 7. Matriz extracelular mineralizada produzida por células osteoblásticas derivadas de calvária de ratos recém-nascidos e cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti, aos 14 dias com os respectivos discos ilustrando a formação dos nódulos de cálcio. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.....40

TABELA

Tabela 1. Valores das medidas de rugosidade (Ra e Rq) das superfícies de Ti Usi; Ti Usi/Col; Ti Nano e Ti Nano/Col.....	35
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 PROPOSIÇÃO	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Obtenção da nanotopografia e do revestimento com colágeno nas superfícies de Ti	24
3.2 Análise da topografia e rugosidade das superfícies de Ti	25
3.3 Cultura de células osteoblásticas derivadas de calvária de ratos recém-nascidos	25
3.4 Avaliação das respostas celulares	26
3.4.1 Viabilidade celular	26
3.4.2 Imunofluorescência indireta para localização da BSP e OPN	27
3.4.3 Atividade de ALP	28
3.4.4 Análise da expressão gênica de marcadores ósseos por PCR em tempo real	29
3.4.5 Formação de matriz extracelular mineralizada	31
3.5 Análise estatística	32
4 RESULTADOS	34
4.1 Análise da topografia e rugosidade das superfícies de Ti	34
4.2 Viabilidade Celular	36
4.3 Imunofluorescência indireta para localização da BSP e OPN	36

4.4 Atividade de ALP.....	38
4.5 Análise da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real.....	38
4.6 Detecção e quantificação da formação de nódulos de matriz extracelular mineralizada	39
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	47
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO

Em Implantodontia, o titânio (Ti) tem sido o biomaterial de escolha na fabricação dos implantes osseointegráveis por apresentar excelente biocompatibilidade, que permite contato direto entre o tecido ósseo e o implante, além de propriedades mecânicas, capazes de suportar as cargas funcionais da mastigação (Albrektsson & Wennerberg, 2004).

Dentre os vários parâmetros que influenciam o sucesso clínico dos implantes dentais, a topografia da superfície dos implantes tem recebido bastante atenção e diferentes estratégias de modificações nas superfícies dos implantes vêm sendo pesquisadas com o objetivo de aumentar e/ou acelerar o processo de osseointegração. Em uma excelente revisão, Puelo & Nanci, 1999 mostram as três abordagens diferentes descritas para mudar a superfície do Ti: físico-química, morfológica e bioquímica. Dentre essas estratégias, destacam-se as modificações físico-químicas, especialmente as alterações topográficas em escala nanométrica por ser uma ferramenta poderosa e que tem a capacidade de modular as respostas dos osteoblastos à superfície de Ti (Mendonça et al., 2010; Bueno et al., 2011) e as modificações bioquímicas, como a imobilização do colágeno tipo I na superfície de Ti (Morra et al., 2006).

No âmbito das alterações morfológicas da superfície do Ti, associações de topografias nas escalas micro e submicrométrica, entre 100-150 nm e menores do que 1 μm (Rosei, 2004), favorecem a proliferação celular (Zinger et al., 2004; Tan & Saltzman, 2004) e a mineralização da matriz extracelular (Wieland et al., 2005). Além disso, observou-se que características nanotopográficas de biomateriais estimulam a formação óssea em contato com o implante (Berglundh et al., 2007; Meirelles et al., 2008). Tais achados têm chamado a atenção de pesquisadores para

os efeitos biológicos de nanotopografias sobre diferentes células e tecidos, incluindo o tecido ósseo (Stevens & George, 2005; Lord et al., 2010; Variola et al., 2011; Wang et al., 2013; Cipriano et al., 2014).

Nesse cenário, a nanotopografia aparece como uma modificação importante, principalmente em locais de baixa qualidade óssea, por poder regular o processo de osseointegração, interferindo na atividade dos osteoblastos em contato com a superfície dos implantes (Kato et al., 2014). Tais superfícies de Ti com nanotopografia podem ser obtidas por um método simples, baseado em desoxidação e reoxidação controladas, por meio de condicionamento químico com solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (de Oliveira & Nanci, 2004; Wazen et al., 2013). Além de produzir uma topografia única, apresentando nanorugosidades com um tamanho médio de 22nm (Yi et al., 2006) e um aumento de três vezes na rugosidade da superfície, este tratamento químico aumenta a espessura da camada de TiO_2 de 5nm para 32-40nm e reduz a presença de contaminantes (Yi et al., 2006), bem como nitrogênio (N) e silício (Si), comparado com uma superfície não tratada de Ti.

As primeiras avaliações da superfície de Ti com nanotopografia, utilizando células osteoblásticas de calvária de ratos, mostraram que nessas superfícies havia maior deposição das proteínas marcadoras da diferenciação osteoblástica, sialoproteína óssea (BSP) e osteopontina (OPN) (de Oliveira & Nanci, 2004 e Bueno et al., 2011). Além disso, como evidência da maior diferenciação osteoblástica nessas superfícies, houve maior formação de matriz mineralizada comparada à superfície não-tratada (de Oliveira et al., 2007). Estudos recentes mostraram o envolvimento das vias de sinalização da proteína óssea morfogenética 2 (BMP-2) e

da integrina $\alpha1\beta1$ no efeito osteoindutor das superfícies com nanotopografia (Kato et al., 2014; Rosa et al., 2014).

Estratégias para promover modificações bioquímicas envolvem a imobilização de moléculas sobre a superfície de Ti. Dentre as moléculas utilizadas, a do colágeno do tipo I tem sido a mais promissora por se tratar da proteína estrutural mais abundante, constituindo aproximadamente 95% da matriz orgânica do tecido ósseo e por seu papel fundamental como mediadora de atividades osteoblásticas, como adesão, diferenciação e síntese de matriz extracelular (Takeuchi et al., 1996; Mizuno et al., 2000; Stange et al., 2013).

Morra e colaboradores realizaram um estudo com implantes de Ti revestidos com uma camada de colágeno tipo I, ligado covalentemente à superfície do biomaterial e instalados em tíbias de coelho que obtiveram uma alta taxa de osseointegração em 4 semanas. Essa ligação do colágeno à superfície do titânio permite a formação de uma camada homogênea sem alterar a sua topografia (Morra et al., 2006; Morra et al., 2011). O revestimento das superfícies usinadas de Ti com colágeno favorece o crescimento da cultura durante a fase proliferativa e a diferenciação durante a fase de maturação da matriz extracelular de osteoblastos derivados de osso alveolar humano (Assis et al., 2009). Experimentos in vivo mostraram que a imobilização de colágeno sobre superfícies de implantes de Ti modificadas por ataque ácido favorece a osseointegração como avaliada pelos métodos histomorfométrico, bioquímico e molecular (Sverzut et al., 2012).

As modificações morfológicas, que resultam em nanotopografia e a bioquímica, obtida por imobilização de colágeno, descritas acima apresentam efeitos benéficos quando utilizadas isoladamente; no entanto, o efeito da associação

dessas modificações de superfície de Ti sobre a osteogênese não foi ainda investigado. Portanto, nós elaboramos a hipótese de que o Ti com nanotopografia revestido com colágeno poderia gerar uma superfície que estimule a osteogênese in vitro com potencial para aumentar e/ou acelerar o processo de osseointegração.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse trabalho foi investigar o efeito de superfície de Ti com nanotopografia revestida com colágeno sobre a osteogênese in vitro. Para tanto, células osteoblásticas derivadas de calvária de ratos recém nascidos foram cultivadas sobre as seguintes superfícies de Ti: usinada (Ti Usi), usinada revestida com colágeno (Ti Usi/Col), com nanotopografia (Ti Nano) e com nanotopografia revestida com colágeno (Ti Nano/Col).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção da nanotopografia e do revestimento com colágeno nas superfícies de Ti

Foram utilizados discos de Ti comercialmente puro, grau 2, de 13 mm de diâmetro e 2 mm de altura (Realum, SP, Brasil). As superfícies de Ti foram lixadas com lixas de silício (grana 320 e 600) e polidas com solução de sílica coloidal. Os discos foram lavados em ultrassom (Odontobras, SP, Brasil) utilizando: água deionizada e detergente enzimático (Merck, HE, Alemanha); álcool 70% (Merck) e água deionizada, por 30 min em cada lavagem. Posteriormente, os discos foram submetidos a quatro tratamentos: (1) superfície Ti Usi; (2) superfície Ti Usi/Col; (3) superfície Ti Nano, e (4) superfície Ti Nano/Col.

A superfície Ti Usi não recebeu qualquer tratamento após o polimento. A superfície Ti Nano foi obtida por condicionamento em solução de H_2SO_4 a 10 N e H_2O_2 a 30% por 4 h à temperatura ambiente (TA), sob agitação constante (Richert et al., 2008; Variola et al., 2008; De Oliveira et al., 2007). O revestimento com colágeno das superfícies Ti Usi e Ti Nano foi realizado pelo Dr. Marco Morra (Nobil Bio Ricerche SRL, Itália) como descrito previamente (Morra et al., 2011). Brevemente, após deposição por plasma de alilamina, os discos de Ti foram imersos em solução de ácido acético a 1% contendo 0,50% de colágeno (Symatase Biomateriaux, França), por 2 h. Os discos foram mantidos por 12 h em água contendo 0,25% N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimidahidroclorídrico e 0,25% N-hidroxissuccinimida. Previamente à utilização nos experimentos in vitro, os discos foram embalados e autoclavados.

3.2 Análise da topografia e rugosidade das superfícies de Ti

As superfícies dos discos de Ti foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando o microscópio Inspect S50 (FEI Company, OR, EUA) operado a 25 kV. A rugosidade foi avaliada por Microscopia de Força Atômica (MFA), utilizando o microscópio NanoScope V (Digital Instruments, NY, EUA) e os dados foram analisados no programa NanoScop Analysis v1.20 (Digital Instruments), que possibilitou a caracterização das superfícies quanto à forma e ondulação. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

3.3 Cultura de células osteoblásticas derivadas 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 (Nanci *et al.*, 1996; Irie *et al.*, 1998; de Oliveira *et al.*, 2004), após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob protocolo nº 2015.1.244.58.5. Os fragmentos das calvárias foram submetidos a três digestões enzimáticas sequenciais com solução de tripsina 0,25% (Gibco, CA, EUA) e 1mg/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, HA, Alemanha) 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, MO, EUA), 7 mM de β -glicerofosfato (Sigma) e 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco). As

células foram contadas no hemocítômetro (Fisher Scientific, PA, EUA) 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, NY, EUA), 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, TU, Alemanha). 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 CO₂ e 95% de ar atmosférico e o meio de cultura foi trocado a cada 48 h.

3.4 Avaliação das respostas celulares

A fim de avaliar o efeito dos diferentes tratamentos das superfícies de Ti sobre as células, foram avaliados os seguintes parâmetros: viabilidade celular, expressão das proteínas BSP e OPN, atividade de fosfatase alcalina (ALP), expressão dos genes: ALP, Colágeno (COL), Osteocalcina (OC), OPN, Osterix (OSX) e *Runt-related transcription factor 2* (RUNX-2) e a formação de matriz extracelular mineralizada.

3.4.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada aos 7 dias pelo ensaio colorimétrico MTT (Tetrazolium {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma). O MTT é um sal que é reduzido em cristais de formazan (cor púrpura) por proteinases mitocondriais de células viáveis (Mosmann, 1983). O meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS, Gibco) a 37°C. As células foram incubadas em meio de cultura contendo MTT a 10% (5

mg/mL) por 4h a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico (Sanyo Electric Co.). Após esse intervalo, o meio foi removido e os cristais solubilizados utilizando 1 mL de isopropanol ácido (100 ml de isopropanol–Merck, em 134 µL de ácido clorídrico a 0,04 N –Merck). As placas de cultura foram mantidas em um agitador de placas (Lab-Line Instruments, IL, EUA) por 5min e uma alíquota de 150 µL da solução de cada poço foi transferida para placas de 96 poços (Corning Incorporated) e a densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 570 nm em espectrofotômetro µQuant (Bio-Tek Instruments Inc., VT, EUA). A viabilidade celular foi expressa como absorbância.

3.4.2 Imunofluorescência indireta para localização da BSP e OPN

Para localização das proteínas BSP e OPN, as culturas de células crescidas sobre as superfícies de Ti foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% (Sigma) em tampão fosfato (PB) 0,1M, pH 7,2, por 10 min à TA. A marcação da OPN foi realizada aos 3 dias de cultura e a da proteína BSP foi aos 7 e 10 dias. As células foram, então, processadas para imunofluorescência indireta conforme descrito anteriormente (de Oliveira et al., 2003 e de Oliveira e Nanci, 2004). A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 (AcrosOrganics, Geel, Bélgica) a 0,5% em PB, durante 10 min, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB, durante 30 min. Anticorpos primários para BSP(1:200, WV1D1-9C5, Developmental Studies Hybridoma Bank, IA, EUA) e OPN (1:800, MPIIB10, Developmental Studies Hybridoma Bank) foram incubados por 1 h, seguido de anticorpo secundário conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 594 (1:200, Molecular Probes – Life Technologies, OR, EUA) por 50 min. Para visualização do

citoesqueleto foi utilizado o marcador Faloidina conjugado com Alexa Fluor 488 (1:200, Molecular Probes – Life Technologies) por 50 min. Para a visualização dos núcleos celulares foi utilizado o marcador DAPI (Molecular Probes – Life Technologies). Após montagem dos discos, com meio de montagem anti-fade Prolong (Molecular Probes – Life Technologies), as marcações foram avaliadas por epifluorescência em microscópio Axio Imager (Zeiss), acoplado a uma câmara fotográfica digital AxionCam MRm (Zeiss). As imagens adquiridas foram sobrepostas e analisadas utilizando-se o programa Adobe Photoshop (Adobe Systems, Software, EUA).

3.4.3 Atividade de ALP

A ALP foi avaliada aos 7 e 10 dias em lisados de células através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando o kit comercial (Labtest Diagnóstica, MG, Brasil). Para obtenção do lisado celular, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com PBS (Gibco) a 37°C. Em seguida os poços foram preenchidos com 1mL de solução lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma) e após 30 min, a solução presente nos poços foi homogeneizada e removidos 50 µL desta solução para os tubos de ensaio. Foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes. Em todos os tubos foram adicionados 50 µL de substrato e 500 µL de solução tampão. No tubo padrão foram acrescentados 50 µL da solução padrão. Os tubos foram incubados a 37°C durante 10 min. Passado esse período, foram adicionados em cada tubo (branco, padrão e testes) 2mL 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 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.

3.4.4 Análise da expressão gênica de marcadores ósseos por PCR em tempo real

Aos 7 dias de cultura, a expressão dos genes ALP, Col, OC, OPN, OSX E RUNX-2 foi avaliada através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR tempo real). Para tanto, o meio de cultura contido em todos os 12 poços foi removido e adicionando 1mL do reagente de Trizol LS (Invitrogen, CA, EUA) ao primeiro poço à TA, por 5 min e sob agitação por pipetagem, para promover a lise das células. Imediatamente após a homogeneização do primeiro poço, esta mistura: Trizol + lisado celular, foi transferida para o próximo poço, e o mesmo procedimento foi repetido até o último poço de cada grupo avaliado. A extração do RNA total foi realizada utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, WI, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320 nm) no aparelho NanoVue plus (GE Healthcare, WI, EUA).

A avaliação da integridade do RNA total foi determinada por meio de eletroforese microfluída utilizando o aparelho Bioanalyzer 2100 Agilent e os chips RNA 6000 Nano Chip (Agilent Technologies, CA, USA). Antes de iniciar o preparo do gel para a eletroforese, todos os reagentes foram mantidos por 15 minutos à TA. Decorrido esse período, foi realizada a preparação do gel pipetando-se 550 μ l do RNA 600 Nano Gel em uma coluna com filtro seguido de centrifugação por 10min a

1500g, à TA. Após centrifugação, uma alíquota de 65µl foi colocada num tubo (Axygen Scientific Inc., CA, USA) de 0,5ml e, em seguida, adicionada 1µl do RNA 6000 Nano Dye. O tubo foi agitado por 10 segundos e centrifugado por 10min a 13000 rpm, à TA (mistura gel/dye). Em seguida, foram pipetados 9µl da mistura gel/dye na região G indicada no RNA 6000 Nano Chip inserido na estação de trabalho. Com o auxílio de uma seringa acoplada à estação de trabalho é exercida a pressão necessária para distribuição do gel por todo o chip. Em seguida, foram pipetados 9µl da mistura gel/dye nos de mais pontos indicados com a letra G. Na sequência, foram pipetados: 1µl do marcador na posição indicada e 5µl do RNA 6000 Nano Marker em cada posição relacionada às amostras assim como na posição do marcador. Por último, 1µl de cada amostra (cerca de 100-150 ng de RNA total) foi adicionado nos respectivos poços sendo o chip agitado no aparelho tipo vórtex IKA MS 3 (IKA, Manca, Hong Kong, China) por 1min a 2200 rpm. O chip foi inserido no aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) e com o auxílio do software Agilent 2100 Expert Software é gerado o resultado final (eletroforograma, densitometria dos géis e valor de RIN – RNA IntegrityNumber). A integridade do RNA ribossômico foi verificada pela visualização de duas subunidades ribossômicas características de células eucarióticas (18S e 28S), sendo consideradas amostras viáveis para a realização dos ensaios de Real time PCR aquelas que apresentaram valores de RIN acima de 7,5.

A fita de DNA complementar (DNAC) foi confeccionada a partir de 1 µg de RNA total, no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems, CA, EUA), de acordo com as instruções do

fabricante. Para a reação de PCR em tempo real, foram utilizadas sondas TaqMan (Applied Biosystems) para os genes-alvo sendo as reações feitas no aparelho (BioRad, EUA). As reações foram realizadas em triplicata (n=3), utilizando: 5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix-NoAmpErase UNG (2X), 0,5 µL das sondas TaqMan para os genes de interesse (20X TaqMan Gene ExpressionAssay Mix) e 4,5µL de DNAC (11,25 ng), para um volume final de 10µL/reação. As reações de amplificação consistiam em 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*ciclethreshold* - ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), que permitirá a análise quantitativa da expressão dos genes avaliados. Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que foi usado para a normalização dos níveis de expressão dos genes avaliados. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com a sonda Taqman utilizada. Foi utilizado o método comparativo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001) para comparar a expressão gênica das culturas sobre as diferentes superfícies estudadas.

3.4.5 Formação de matriz extracelular mineralizada

Aos 14 dias de cultura, a formação de matriz mineralizada das células crescidas sobre as diferentes superfícies foi avaliada pela marcação com vermelho de Alizarina (Sigma). Para isso, os poços com os discos foram lavados três vezes com solução tampão PBS (Gibco) aquecido a 37°C e preenchidos com

paraformaldeído a 4% (LabSynth, SP, Brasil) por 24 h. Na sequência, os poços foram desidratados em série crescente de alcoóis (30%; 50%; 70% e 96%), de maneira gradual, por 1h cada graduação alcoólica. Em seguida, os discos foram corados com vermelho de Alizarina para corar as áreas de mineralização ricas em cálcio. Para a análise qualitativa, os discos foram removidos dos poços e fotografados com câmera fotográfica digital de alta resolução (Nikon, TO, Japão). As imagens obtidas foram processadas utilizando o programa Adobe Photoshop (Adobe Systems). Para análise quantitativa, foi realizada a extração do vermelho de Alizarina, de acordo com o método previamente descrito (Gregory et al., 2004). Foram adicionados 280 µL de ácido acético (Acros Organics) a 10% em cada poço e mantidos à TA por 30 min sob agitação suave. Após esse período, a camada de células foi raspada e a solução dos poços foi homogeneizada e transferida para tubos de 1,5 mL. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 85°C por 10 min e transferidos para o gelo por 5 min. Os tubos foram então centrifugados a 1300 rpm por 20 min (Fischer Scientific) e 100 µL do sobrenadante foram transferidos para placas de 96 poços (Corning Incorporated) contendo 40 µL de hidróxido de amônio a 10% (Reagen, RJ, Brasil). Por fim, a absorbância foi medida em espectrofotômetro µQuant (BioTek Instruments Inc., VT, EUA) em um comprimento de onda de 405 nm. Os dados da formação de matriz extracelular mineralizada foram expressos por absorbância.

3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Sigmaplot11.0 (Systat Software, Alemanha). Os dados obtidos foram agrupados e tabulados para realizar a

estatística descritiva (média aritmética e desvio padrão) para que fossem apresentados em forma de gráficos.

Os ensaios de atividade de ALP e formação de matriz extracelular mineralizada foram realizados em quintuplicata (n=5), a expressão gênica dos marcadores ósseos, em triplicata (n=3) e a proliferação celular em quadruplicata (n=4). Todos os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls. Para todos os testes, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da topografia e rugosidade das superfícies de Ti

A topografia das superfícies dos discos de Ti foi analisada a partir de fotomicrografias obtidas por MEV (Fig. 1) e de imagens tridimensionais por MFA (Fig. 2). As imagens da MEV de todas as superfícies Ti, em menor aumento (Fig. 1, A-D), evidenciaram topografias similares com a presença de ranhuras em várias direções.

Entretanto, em maior aumento, foi evidenciado que os discos de Ti Usi e Ti Nano, com ou sem colágeno, apresentavam topografias de superfície bastante diferentes (Fig. 1, E-H). Os discos de Ti Usi e Ti Usi/Col apresentaram topografias semelhantes entre si (Fig. 1, E-F) e somente nos discos de Ti Nano e Ti Nano/Col foi observada a presença de nanoporos, sem qualquer diferença causada pelo revestimento com colágeno (Fig. 1, G-H).

Figura 1. Micrografia por MEV das superfícies de Ti. Barra de escala: A-D=100µm e E-H= 500nm.

Figura 2. Topografia por MFA de superfícies de Ti.

As imagens tridimensionais das superfícies de Ti obtidas por MFA, em geral, confirmam as observações feitas com MEV. Em todas as superfícies foram observadas as ranhuras produzidas pelo polimento e naquelas com nanotopografia pode-se observar a presença dos nanoporos (Fig. 2). Ainda confirmando as observações da MEV, o revestimento com colágeno não alterou a topografia das superfícies Ti Usi e Ti Nano.

Dois parâmetros bidimensionais de rugosidade foram obtidos pelo programa NanoScope Analysis, a partir das imagens da área de $10\ \mu\text{m}^2$, o Ra e o Rq (Tabela 1).

Tabela 1. Valores das medidas de rugosidade (Ra e Rq) das superfícies de Ti Usi; Ti Usi/Col; Ti Nano e Ti Nano/Col

Superfícies de Ti	Medias de Rugosidade (nm)	
	Ra	Rq
Ti Usi	23,5	28,8
Ti Usi/Col	9,5	14,6
Ti Nano	40	50,1
Ti Nano/Col	38,9	46,3

4.2 Viabilidade Celular

O recobrimento com colágeno demonstrou favorecer a viabilidade celular entre os grupos estudados. O grupo Ti Usi/Col apresentou maior viabilidade celular comparado ao grupo Ti Usi ($p= 0,008$), bem como o grupo Ti Nano/Col em comparação com o grupo Ti Nano ($p< 0,001$). A viabilidade celular foi maior quando associamos os dois tratamentos de superfície Ti Nano/Col (Fig. 3).

Figura 3. Viabilidade celular de células osteoblásticas derivadas de calvária de ratos recém-nascidos cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti aos 7 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=4$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.

4.3 Imunofluorescência indireta para localização da BSP e OPN

A marcação para OPN aos 3 dias foi predominantemente intracelular em região perinuclear, correspondente ao Complexo de Golgi, nos grupos Ti Usi e Ti Usi/Col (Fig. 4, A-B). Nos grupos Ti Nano e Ti Nano/Col observou-se, adicionalmente, forte marcação de aspecto granular por todo o citoplasma, além de depósitos extracelulares adjacentes às células (Fig. 4, C-D). A marcação para BSP (fluorescência vermelha) aos 7 dias foi predominantemente citoplasmática nos 4 grupos estudados, sendo possível notar, no grupo Ti Nano/Col, a presença de

depósitos extracelulares (Fig. 4, E-H). Aos 10 dias, formações de multicamadas celulares exibiam marcação para BSP em região perinuclear em todos os grupos avaliados, além de marcações extracelulares difusas sobre as superfícies Ti Nano e Ti Nano/Col (Fig. 4, I-L).

Figura 4. Imunofluorescência indireta de células osteoblásticas derivadas de calvária de ratos recém-nascidos cultivadas sobre as superfícies Ti Usi (A; E; I), Ti Usi/Col (B; F; J), Ti Nano (C; G; K) e Ti Nano/Col (D; H; L) para localização de OPN (A-D) aos 3 dias e de BSP (E-L) aos 7 e 10 dias de cultura. O citoesqueleto de actina (A-D) é visualizado em verde (Faloidina + Alexa Fluor 488) e os núcleos celulares (A-L), em azul (DAPI). Barra de escala para (A-D) = 50µm; (E-H) = 100 µm e (I-L) = 200 µm.

4.4 Atividade de ALP

A atividade de ALP foi diferente entre as superfícies avaliadas ($p < 0,001$) e aumentou ao longo do tempo de cultura ($p < 0,001$), sendo $7 < 10$. Aos 7 dias, a atividade de ALP do grupo Ti Usi apresentou menor atividade em relação aos grupos Ti Nano e Ti Nano/Col ($p < 0,05$). Aos 10 dias, a atividade de ALP foi maior nos grupos Ti Nano e Ti Nano/Col, sendo a maior atividade apresentada pelo grupo Ti Nano/Col ($p < 0,05$). (Fig. 5).

Figura 5. Atividade de ALP (expressa como μmol de timolftaleína/h/mg de proteína total) de células osteoblásticas derivadas de calvária de ratos recém-nascidos, cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti, aos 7 e 10 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.

4.5 Análise da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real

A expressão de todos os genes avaliados, após 7 dias, foi maior nas células crescidas sobre as superfícies Ti Nano e Ti Nano/Col em relação às superfícies Ti Usi e Ti Usi/Col. As células cultivadas sobre a superfície Ti Nano/Col apresentaram maior expressão para os genes (COL; OC; OSX) ($p < 0,05$). A superfície Ti Nano apresentou maior expressão para o gene OPN ($p < 0,05$). A expressão dos genes (ALP e RUNX-2) foi similar entre os grupos Ti Nano e Ti Nano/Col, com $p = 0,196$ $p =$

0,743 respectivamente. As células sobre a superfície Ti Usi/Col apresentaram menor expressão para os genes (ALP; OC; OPN; RUNX2) ($p < 0,05$). A superfície Ti Usi apresentou expressão similar à Ti Usi/Col para os genes: COL ($p = 0,808$) e OSX ($p = 0,34$) (Fig. 6).

Figura 6. Expressão dos genes das células osteoblásticas provenientes da calvária de ratos recém-nascidos cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti, aos 7 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo, GAPDH, e calibrados em relação ao controle. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.

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

Ao final de 14 dias, todas as superfícies apresentaram nódulos de matriz extracelular mineralizada evidenciados pelo vermelho de Alizarina (Fig. 7). A análise qualitativa detectou que as células cultivadas sobre as superfícies Ti Usi/Col e Ti Nano/Col apresentavam-se mais fortemente coradas quando comparadas com as

superfícies Ti Usi e Ti Nano (Fig. 7). Após obtenção das imagens foi realizada a extração do vermelho de Alizarina e a sua quantificação. A quantificação confirmou os dados qualitativos, com aumento da quantidade de matriz extracelular mineralizada nas células crescidas sobre as superfícies revestidas com colágeno Ti Usi/Col e Ti Nano/Col em relação às superfícies Ti Usi e Ti Nano, dentre as quais não foi detectada diferença estatisticamente significativa ($p=0,519$).

Figura 7. Matriz extracelular mineralizada produzida por células osteoblásticas derivadas de calvária de ratos recém-nascidos e cultivadas sobre as diferentes superfícies de Ti, aos 14 dias com os respectivos discos ilustrando a formação dos nódulos de cálcio. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado para verificar como as modificações morfológicas, obtidas pela nanotopografia, e bioquímicas, obtidas pelo revestimento com colágeno, das superfícies de Ti afetam a osteogênese in vitro. Em geral, observou-se maiores expressões genotípicas e fenotípicas, dos eventos iniciais e intermediários da osteogênese, nas células osteoblásticas cultivadas sobre as superfícies com nanotopografia, revestidas ou não com colágeno. No entanto, o efeito do revestimento com colágeno foi mais relevante para aumentar o evento final da osteogênese, que é a formação de matriz mineralizada.

A caracterização das superfícies mostrou que o condicionamento da superfície de Ti produz uma morfologia nanotopográfica exibindo a presença de “nanopits”, como mostrado anteriormente (de Oliveira et al., 2007; Kato et al., 2014; Rosa et al., 2014). O revestimento com colágeno não alterou essa morfologia nanotopográfica e nem a morfologia da superfície usinada, como observado por MEV e MFA. Tais resultados estão de acordo com observações anteriores em que superfícies de Ti com diferentes topografias não foram modificadas pelo colágeno (Morra et al., 2003; Assis et al., 2009). Em relação aos parâmetros de rugosidade avaliados, os maiores valores para Ra e Rq foram os das superfícies Ti Nano e Ti Nano/Col, indicando maior rugosidade para essas superfícies em relação às superfícies Ti Usi e Ti Usi/Col. Entretanto, é importante salientar que os valores encontrados são referentes ao escaneamento de uma área de 10 μm^2 de uma amostra de cada grupo, portanto, são limitados e não permitiram análise estatística. Apesar disso, nossos resultados corroboram os trabalhos realizados por Morra et al.

(2003) que relatam aumento na rugosidade, expressos como Ra e Rq, em superfícies tratadas com condicionamento ácido.

Como já amplamente demonstrado na literatura, as superfícies de Ti, independentemente da topografia, não afetam a viabilidade de células cultivadas sobre elas. Resposta similar foi observada nesse estudo, no qual células viáveis estavam presentes em todas as superfícies avaliadas. Considerando que essa avaliação foi realizada aos 7 dias e que o aumento na absorbância corresponde ao aumento na quantidade de células (Mosmann, 1983), é possível inferir que as pequenas diferenças observadas na viabilidade celular se devam às diferenças na proliferação dessas células. Assim, comparando as quantidades de células nas superfícies nanotopográficas e usinadas, observa-se um discreto efeito do revestimento com colágeno em aumentar a proliferação. Por outro lado, embora estudos anteriores tenham mostrado maior proliferação celular em superfície de Ti com nanotopografia (de Oliveira et al., 2007; Rosa et al., 2014), nossos resultados não corroboram com essas observações. Tal discrepância pode ser devida aos métodos utilizados porque nesse estudo a proliferação foi feita por método bioquímico e naqueles, por contagem direta do número de células.

As células crescidas sobre as superfícies Ti Nano e Ti Nano/Col apresentaram padrões de marcação de OPN e BSP diferentes em relação às superfícies Ti Usi e Ti Usi/Col, com fortes marcações por todo o citoplasma e região perinuclear, além de depósitos extracelulares adjacentes às células. Tais diferenças parecem ser induzidas pela nanotopografia que estimularia a síntese e secreção dessas proteínas, sem evidências de efeitos induzidos pelo revestimento com colágeno. Suportando essa interpretação, existem evidências anteriores que, utilizando o mesmo modelo de cultura de células, mostraram aumento nas

expressões de OPN e BSP induzido pela nanotopografia (Bueno, et al., 2011; de Oliveira et al., 2007; de Oliveira et al., 2004; de Oliveira et al., 2003), que se deve ao aumento da atividade osteoblástica (de Oliveira et al., 2006).

A atividade de ALP é característica do processo de diferenciação osteoblástica e considerada fundamental para ocorrer o processo de mineralização (Beck et al., 1998). Essa atividade foi detectada em todas as culturas celulares, independentemente das superfícies de Ti, e aumentou de 7 para 10 dias, conforme padrão observado anteriormente para essas culturas osteoblásticas (Felix & Fleisch, 1979). Em relação às superfícies de Ti, as diferenças mais significativas foram observadas aos 10 dias, quando se detectou maior atividade de ALP nas células cultivadas sobre Ti Nano e Ti Nano/Col, mostrando que a nanotopografia induz aumento dessa atividade, que é ainda mais estimulada pelo revestimento com colágeno. Essa observação é corroborada parcialmente pela avaliação da expressão gênica dos marcadores osteoblásticos, que para todos os genes avaliados foi maior nas superfícies com nanotopografia. A expressão de ALP seguiu o mesmo padrão de resposta da atividade de ALP, ou seja, aumentada nas culturas sobre Ti Nano e Ti Nano/Col. Os genes, COL, OC e OSX apresentaram uma expressão ainda maior sobre Ti Nano/Col sugerindo efeito sinérgico entre a nanotopografia e o colágeno. Por outro lado, a expressão de RUNX2 não foi diferente entre as superfícies com nanotopografia e a de OPN foi maior na Ti Nano comparada com Ti Nano/Col.

O evento final da osteogênese, que é a mineralização da matriz extracelular, foi observado em todas as superfícies, mas como ela foi maior no Ti Usi/Col e Ti Nano/Col, isso sugere que o revestimento com colágeno foi mais eficaz em promover esse aumento da mineralização do que a topografia das superfícies. Esse discreto efeito estimulante de revestimento com colágeno sobre a formação da

matriz mineralizada foi relatado anteriormente quando se utilizou um modelo de cultura similar àquele utilizado nesse estudo (Pereira et al., 2013), embora não tenha sido observado em cultura de células osteoblásticas derivadas de explantes ósseos (Assis et al., 2009). Por outro lado, não foi observada diferença estatisticamente significativa na quantidade de matriz mineralizada entre as superfícies usinada e nanotopográfica, embora valores maiores de absorbância sejam observados para Ti Nano comparado à Ti Usi. Tal resultado está em desacordo com um dos nossos estudos anteriores, no qual a nanotopografia induziu um aumento 4 vezes maior na mineralização (de Oliveira et al., 2007). Em parte essa discrepância pode ser devida aos métodos utilizados para quantificação dessa matriz, bioquímico nesse estudo e semi-quantitativo no estudo anterior.

Os resultados desse estudo sugerem que a modificação da superfície do Ti pela combinação de nanotopografia e revestimento com colágeno apresenta efeito sinérgico em alguns dos eventos intermediários da osteogênese in vitro, mas que não necessariamente resultam em aumento na formação da matriz mineralizada.

Em conformidade com a literatura (de Oliveira et al., 2006; Rosa et al., 2014) nossos resultados apresentaram um aumento da atividade de ALP ao longo do tempo, atingindo seu pico após 10 dias de cultivo em todos os grupos avaliados. Semelhantemente aos resultados apresentados por Rosa et al. (2014), a superfície de Ti Nano apresentou maior atividade de ALP comparada à superfície Ti Usi. Nossos resultados para o grupo Ti Usi/Col se equivalem aos de alguns autores (Becker et al., 2002), que relatam que o revestimento com colágeno não aumentou a atividade de ALP em culturas de células de calvária de ratos. Entretanto, Morra et al. (2010), relataram um aumento na atividade de ALP em cultura de SAOS-2 crescidas em contato com a superfície de Ti revestidas com colágeno.

No presente estudo, os resultados da expressão quanto à atividade de ALP foram semelhantes após 7 e 10 dias de cultivo respectivamente. As células crescidas sobre as superfícies com nanotopografia, Ti Nano e Ti Nano/Col, apresentaram maior atividade e maior expressão de ALP. Contudo, aquelas crescidas sobre a superfície Ti Usi/Col não mostraram bons índices de atividade de ALP. Como descrito anteriormente por de Oliveira et al.(2007) e Rosa et al.(2014), a atividade de ALP apresenta-se mais elevada, em superfícies de Ti com nanotopografia em comparação com superfície usinada, após 10 dias de cultura. O resultado da atividade de ALP, do grupo Ti Usi/Col, difere daqueles obtidos por Becker et al.(2002) e Assis et al. (2009) que relatam em seus estudos que o revestimento da superfície de Ti com colágeno não interfere na atividade de ALP. Diferentemente dos nossos resultados, Sverzut et al.(2012) relatam um aumento na atividade de ALP nas culturas de células em contato com a superfície de Ti com revestimento de colágeno. Apesar disso, é possível que a discordância entre nossos resultados e os encontrados por Sverzut et al. (2012) e Assis et al. (2009), deva-se às diferentes culturas utilizadas por nossas pesquisas.

Neste trabalho, a expressão dos outros genes marcadores do fenótipo osteoblástico, mostra que as superfícies com nanotopografia, Ti Nano e Ti Nano/Col, tem o potencial de influenciar o processo de diferenciação osteoblástica em cultura de células derivadas de calvária de ratos recém-nascidos. O aumento da capacidade de diferenciação osteoblástica fica claro entre os grupos Ti Nano e Ti Nano/Col, após a mensuração da expressão dos genes RUNX2 e OSX (Komori et al., 1997; Ducky et al., 1999; Nakashima et al., 2002). O atraso na diferenciação osteoblástica, observado nas superfícies Ti Usi e Ti Usi/Col, pode ser explicado pela baixa expressão do gene OC, marcador final da osteogênese e expresso por osteoblastos

maduros (Ducy et al., 1996). Sua expressão está aumentada nas superfícies Ti Nano e Ti Nano/Col, com destaque para esta última, indicando que essas superfícies influenciam o processo de diferenciação osteoblástica. Em consonância com os resultados obtidos por Morra et al (2011), que relatam que a expressão do gene Col só mostra diferença após a segunda semana de cultivo, nossos resultados após 7 dias, apresentaram-se semelhantes entre as superfícies Ti Usi e Ti Usi/Col.

Embora, as superfícies com tratamento com nanotopografia apresentassem melhores resultados para a expressão gênica dos marcadores do fenótipo osteoblástico, estes resultados não foram observados para a detecção e quantificação da formação de nódulos da matriz extracelular mineralizada. O grupo Ti Nano apresentou formações de matriz mineralizada extracelular semelhante ao grupo Ti Usi. No entanto, o grupo Ti Nano/Col juntamente com o grupo Ti Usi/Col apresentaram maiores formações de matriz mineralizada. 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).

Os resultados do presente estudo evidenciam que tanto os tratamentos físico-químicos quanto os bioquímicos realizados nas superfícies de Ti são capazes de influenciar o potencial de diferenciação osteoblástica das células derivadas de calvária de ratos recém-nascidos crescidas sobre essas superfícies.

6 CONCLUSÃO

Esses resultados sugerem que a combinação de nanotopografia com revestimento com colágeno de superfícies de Ti estimula os eventos intermediários da osteogênese e tem potencial para favorecer a osseointegração dos implantes de Ti.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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

Becker D, Geißler U, Hempel U, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H, Wenzel KW. Proliferation and differentiation of rat calvarial osteoblasts on type I collagen-coated titanium alloy Inc. *J Biomed Mater Res* 59: 516–527, 2002.

Beck GR, Jr., Sullivan EC, Moran E, Zerler B. Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell Biochem*. 1998; 68:269–280.

Berglundh T, Abrahamsson I, Albooy JP, Lindhe J. Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18:147-152.

Bueno RBL, Adachi P, Castro-Raucci LMS, Rosa AL, Nanci A, de Oliveira PT. Oxidative Nanopatterning of Titanium Surfaces Promotes Production and Extracellular Accumulation of Osteopontin. *Braz Dent J*. 2011; 22:179-184.

Cipriano AF, De Howitt N, Gott SC, Miller C, Rao MP, Liu H. Bone marrow stromal cell adhesion and morphology on micro- and sub-micropatterned titanium. *J Biomed Nanotechnol* 2014; 10:660-668.

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; 25:403-413.

De Oliveira PT, Rosa AL, Zalzal S, Richert L, Yi J-H, Wuest J, Rosei F, Nanci A. Controlled chemical oxidation of titanium creates a nanotopography that enhances in vitro osteogenesis. In Transactions of the 31st Annual Meeting of the Society for Biomaterials, Mount Laurel, NJ: Society for Biomaterials. 2006; 29:54. Abstract no. 378.

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

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.

Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. Genes Dev. 1999 Apr 15;13 (8):1025-36.

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

Felix R, Fleisch H. Increase in Alkaline Phosphatase Activity in Calvaria Cells Cultured with Diphosphonates. Biochem. J. 1979; 183:73-81.

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

Irie K, Zalzal S, Ozawa H, McKee MD, Nanci A. Morphological and immunocytochemical characterization of primary osteogenic cell cultures derived from fetal rat cranial tissue. Anat Rec. 1998; 252:554-67.

Kato RB, Roy B, De Oliveira FS, Ferraz EP, De Oliveira PT, Kemper AG, Hassan MQ, Rosa AL, Beloti MM. Nanotopography directs mesenchymal stem cells to osteoblast lineage through regulation of microRNA-SMAD-BMP-2 circuit. J Cell Physiol doi: 2014; 10.1002/jcp.24614.

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.

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.

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

Meirelles L, Melin L, Peltola T, Kjellin P, Kangasniemi I, Currie F, Andersson M, Albrektsson T, Wennerberg A. Effect of hydroxyapatite and titania nanostructures on early in vivo bone response. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2008; 10:245-254.

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

Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y. Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen- α 2 β 1 integrin interaction. *J Cell Physiol*. 2000; 184:207-213.

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

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

Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Bollati D, Rodriguez y Baena R. Multifunctional implant surfaces: surface characterization and bone response to acid-etched Ti implants surface modified by fibrillar collagen I *J. Biomed. Mater. Res*. 2010; A 94: 271–9

Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Bollati D and Baena RR. Gene expression of markers of osteogenic differentiation of human mesenchymal cells on collagen I-modified microrough titanium surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2011; A 96:449-455.

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.

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002; Jan 11;108(1):17-29.

Nanci A, Zalzal S, Gotoh Y, McKee MD. Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microsc Res Tech*. 1996; 33:214–31.

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.

Pereira KK, Alves OC, Novaes AB Jr, de Oliveira FS, Yi JH, Zaniquelli O, Wolf Brandstetter C, Scharnweber D, Variola F, Nanci A, Rosa AL, de Oliveira PT. Progression of osteogenic cell cultures grown on microtopographic titanium coated with calcium phosphate and functionalized with a type I collagen-derived peptide. *J Periodontol*. 2013 Aug; 84(8):1199-210.

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

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

Rosa AL, Kato RB, Castro Raucchi LMS, Teixeira LN, de Oliveira FS, Bellesini LS, de Oliveira PT, Hassan MQ, Beloti MM. Nanotopography Drives Stem Cell Fate Toward Osteoblast Differentiation Through $\alpha 1 \beta 1$ Integrin Signaling Pathway. *J. Cell. Biochem*. 2014; 115: 540–548.

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

Stange R, Kronenberg D, Timmen M, Everding J, Hidding H, Eckes B, Hansen U, Holtkamp M, Karst U, Pap T, Raschke MJ. Age-related bone deterioration is diminished by disrupted collagen sensing in integrin $\alpha 2\beta 1$ deficient mice. *Bone*. 2013; 56:48-54.

Stevens MM, George JH. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*. 2005; 310:1135-1138.

Sverzut AT, Crippa GE, Morra M, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Effects of type I collagen coating on titanium osseointegration: histomorphometric, cellular and molecular analyses. *Biomed Mater*. 2012; 7:035007.

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

Takeuchi Y, Nakayama K and Matsumoto T. Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor- β receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells. *J Biol Chem*. 1996; 271:3938-3944.

Variola F, Yi JH, Richert L, Wuest JD, Rosei F, Nanci A. Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation. *Biomaterials*. 2008; 29:1285-1298.

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; 3:335-353.

Wang W, Zhao L, Wu K, Ma Q, Mei S, Chu PK, Wang Q, Zhang Y. The role of integrin-linked kinase/ β -catenin pathway in the enhanced MG63 differentiation by micro/nano-textured topography. *Biomaterials*. 2013; 34:631-640.

Wazen RM, Kuroda S, Nishio C, Sellin K, Brunski JB, Nanci A. Gene expression profiling and histomorphometric analyses of the early bone healing response around nanotextured implants. *Nanomedicine*. 2013; doi:10.2217/nnm.12.167.

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

Yi J-H, Bernard C, Variola F, Zalzal SF, Wuest JD, Rosei F, Nanci A. Characterization of a bioactive nanotextured surface created by controlled chemical oxidation of titanium. *Surf Sci*. 2006; 600:4613-4621.

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